

Titre: Façonnage de la surface de nanoparticules pour la délivrance de gènes
Title:

Auteur: Charles Fortier
Author:

Date: 2015

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Fortier, C. (2015). Façonnage de la surface de nanoparticules pour la délivrance de gènes [Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
Citation: <https://publications.polymtl.ca/1791/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/1791/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Gregory De Crescenzo, & Yves Durocher
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

FAÇONNAGE DE LA SURFACE DE NANOPARTICULES
POUR LA DÉLIVRANCE DE GÈNES

CHARLES FORTIER

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

JUIN 2015

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

FAÇONNAGE DE LA SURFACE DE NANOPARTICULES
POUR LA DÉLIVRANCE DE GÈNES

présentée par : FORTIER Charles

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

M. VIRGILIO Nick, Ph. D., président

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. DUROCHER Yves, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. BUSCHMANN Michael, Ph. D., membre

Mme GILLIES Elizabeth R., Ph. D., membre

DÉDICACE

À la mémoire de mon père.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je remercie les professeurs Gregory De Crescenzo et Yves Durocher. J'ai beaucoup de chance d'avoir pu bénéficier de vos supervisions et de vos personnalités. Les opportunités que vous m'avez offertes et la confiance que vous m'avez accordée ont beaucoup compté pour moi. Vous avez réussi à me mettre en confiance et à me challenger en même temps. Greg, j'apprécie beaucoup la manière dont notre relation a évolué entre mes débuts au projet jusqu'à sa conclusion. En regardant le chemin parcouru, je me rends compte que j'ai bien changé en 5 ans, et côté maturation scientifique c'est pour beaucoup grâce à tout ce que j'ai appris par nos échanges.

Le lab est une place spéciale, avec des gens provenant de tous les continents (à l'exception de l'Antarctique, mais l'hiver s'occupe bien de le représenter chaque année). Comme j'ai eu la chance de travailler dans deux groupes, ça fait deux fois plus de personnes qui me manqueront et que je remercie de tout le fun passé ensemble, de tout ce que j'ai appris à leur contact. Côté Poly en particulier, merci à Ben pour l'idée simple et géniale de cuisiner en groupe, et donc merci à Olga pour son борщ, à Sam pour ses crêpes au saumon, à Ben pour son chicon gratin et à Fred pour ses lasagnes. Et côté IRB en particulier, l'entrain de Roseanne, la sollicitude de Denis, les éclats de rire de Sylvie, la vivacité de Christian, la gentillesse de Louis, l'esprit de Gilles, le softball d'Antoine, l'allégresse de Johnny et les facéties de Brian sont autant de points forts de ces gens exceptionnels desquels j'ai eu la chance d'être entouré. Merci à mes nombreux collègues étudiants, stagiaires et postdocs – en particulier Sam, Fred, Massi, Élodie, Laurence, Céline, Vishal, Igor, Benjamin, July, Cécile, Nesrine, Pauline, Christine, Olga, Adeline, Florian, Éric, Antoine, et tous les autres avec lesquels j'ai partagé les hauts et les bas, les rires et les déceptions devant un gel ou une culture contaminée, l'agacement et l'émerveillement sur un spectre ou un micrographe. Merci à tous – et tout spécialement à toi Fred – d'avoir été mes compagnons de voyage durant ce doctorat, qui est un peu comme une partition de musique : les pauses comptent autant que les notes, alors merci à mes complices de pauses. Je garde avec moi l'assurance de vous revoir de temps à autre avec plaisir, au détour d'une conférence, ou simplement en vacances.

I also want to thank the Moores, my “American family” – Angie and Big Ernie, Christine, Marc, and Ernie. The English I can speak today is mostly the result of our time together. We spent countless hours learning from each other and having a ton of fun for many summers on and

I am very fond of these great memories. You have always made me feel at home in this continent, and thanks to you I already felt secure and confident when I landed in Montréal for the first time.

J'aimerais aussi remercier ma famille, qui m'a offert un soutien sans faille et de première importance pour mener ces travaux à bien, et en particulier lors du passage direct de la maîtrise au doctorat. Pierre, je pense qu'on est très fiers l'un de l'autre et ça compte énormément pour moi. Quand j'ai confiance en moi, je parle comme toi. Quand j'ai un événement important, je me tiens comme toi. Quelle chance j'ai d'être le petit-fils de Marie-José et René! (plus connus sous les noms Mamy et Papy) Vous êtes tous les deux mes modèles. Mamy, tes courriers, ta cuisine évidemment, tes tablettes de chocolat sont autant d'attentions qui m'accompagnent au quotidien et me font chaud au cœur. Papy j'ai toujours bénéficié de tes conseils et ton sens pratique, j'adore ton humour et j'admire tes grands talents de créateur. Maman, merci pour tout. Quel travail tu as fait pour que Pierre et moi en soyons là aujourd'hui! Nos voyages, nos rencontres, tout ça c'est grâce à toi. Je sais que j'ai bien de la chance de t'avoir comme maman. Papa, avec le recul je pense que tu savais depuis longtemps que j'étais fait pour la recherche, et tu m'as subtilement permis de le découvrir par moi-même en me créant des opportunités au bon moment. Ta curiosité, ta soif d'apprendre, ton humour, ton esprit critique, ta débrouillardise, ta méticulosité... tout ça nous manque chaque jour depuis que tu nous as brusquement quittés. Si tu pouvais lire ces lignes, tu verrais que je continue quand même à apprendre et à utiliser des mots invraisemblables de la langue française avec laquelle tu aimais tant jongler.

À propos de mots, j'aimerais aussi remercier ceux qui commencent par polyplex- (555), gène (472), ADN (428), transfect- (239), *in vitro* (85), *in vivo* (96), et délivrance (65) qui représentent à eux seuls 3% de cette thèse.

Enfin, Sam, merci à toi pour tout ce que tu es. Tu remets mes idées dans l'ordre, tu m'en donnes de nouvelles, parfois sans même t'en apercevoir tellement ça t'est naturel. Je ne peux pas m'imaginer comment j'aurais pu accomplir tout ça sans que tu aies été à mes côtés. Je suis impatient d'aller de l'avant après ce doctorat même si c'est dans le brouillard, parce qu'on sera là l'un pour l'autre.

Comme toutes les bonnes choses ont une fin, j'arrêterai mes remerciements ici.

Dorénavant, je ne suis plus juste Français, je suis aussi un peu Québécois.

RÉSUMÉ

La **vectorisation de gènes** est devenue un outil incontournable dans les nouvelles biotechnologies. Elle est également au cœur de la recherche et du développement de thérapies géniques, qui visent à introduire du matériel génétique dans le noyau de cellules ciblées. L'ADN à transporter étant fragile, la plupart des techniques de vectorisation se fondent sur l'emploi de nanoobjets capables d'encapsuler et de protéger cet ADN. Ils permettent également le transport du gène jusqu'au noyau des cellules visées pour en permettre l'expression.

Ces nanovecteurs sont formés à partir de divers matériaux, incluant des polymères. En particulier, les **polyplexes** sont des nanovecteurs issus de la complexation entre de l'ADN et un polymère chargé positivement. Les travaux présentés ici consistent à approfondir le rôle de l'interface entre un modèle de polyplexe et l'environnement physiologique et cellulaire avec lesquels il va interagir lors du processus de délivrance de gènes ou transfection. En particulier, dans le cadre de la lutte contre le cancer, la délivrance systémique est envisagée afin de permettre aux polyplexes de s'accumuler dans le tissu tumoral, ainsi que ses éventuelles métastases. L'enjeu est donc double : Il s'agit de doter les polyplexes de *ligands* leur permettant de cibler les cellules cancéreuses afin de livrer le gène au bon endroit ; et également d'un *revêtement* de surface les rendant capables de circuler sans encombre dans le sang tout en limitant leur élimination par le système des phagocytes mononucléés.

Dans une première étude, nous avons mis en place un **système d'accroche de ligands** à la surface de polyplexes. Nous nous sommes basés sur le tandem de peptides E/Kcoil : deux peptides permettent un attachement stable, orienté et spécifique entre deux entités par auto-assemblage en solution. D'un côté, nous avons choisi un ligand : le facteur de croissance épidermique étiqueté avec le peptide Ecoil par ingénierie moléculaire (Ecoil-EGF) ; et de l'autre côté, un polyplexe décoré avec le peptide complémentaire Kcoil a été mis au point. Pour ce faire, un polymère cationique – le polyéthylèneimine branché (bPEI) – a été fonctionnalisé avec une petite molécule réactive vers le peptide Kcoil. Les polyplexes formés avec ce PEI activé ont pu être décorés en surface en y greffant le peptide Kcoil. Ce système nous a permis d'étudier finement l'influence de la densité de ligand en surface du polyplexe par rapport à leur absorption par des cellules cancéreuses A431 sur-exprimant le récepteur de l'EGF (EGFR). Nous avons

ainsi mis en évidence un effet de palier reliant le taux d'internalisation des polyplexes par les cellules A431 *via* l'interaction EGF/EGFR et la quantité de ligands sur les polyplexes.

Ensuite, une deuxième étude a été menée au sujet de l'enrobage électrostatique de polyplexes au moyen de dextrane carboxyméthylé (CMD). Ici l'objectif était de dégager des relations entre la structure du revêtement – la **densité de charge** et le **poids moléculaire** du CMD utilisé – et sa fonction vis-à-vis de l'environnement physiologique. Nous avons préparé et caractérisé une chimiothèque de 26 CMD en opérant la carboxyméthylation contrôlée de 4 dextrans de poids moléculaires différents. Un protocole de revêtement électrostatique simple et robuste a été mis en place afin de mener une étude systématique de l'ensemble de la chimiothèque. Chaque formulation de polyplexes enrobés a été testée vis-à-vis de constituants du milieu physiologique découplés les uns des autres : petits ions, DNases, protéines du plasma, globules rouges, et cellules ciblées. Nous avons observé des tendances monotones entre chacun des deux paramètres et l'encapsulation de l'ADN. À notre grande surprise, ces observations n'ont pas été corrélées avec la protection de l'ADN contre la dégradation par les DNases, cette dernière se révélant corrélée à l'expression de gènes par les cellules ciblées. La stabilité des polyplexes a été évaluée en présence d'une concentration physiologique en sels ; ce qui a indiqué que les deux paramètres étudiés avaient une influence couplée pour prévenir l'agrégation des polyplexes. Au niveau de la surface des polyplexes, cette influence s'est traduite en termes de stabilisation stérique et latérale plutôt qu'en termes de charge de surface (potentiel zêta). En revanche, ce dernier s'est avéré un fort prédicteur de la capacité des polyplexes enrobés à éviter à la fois leur opsonisation ainsi que l'agrégation d'érythrocytes. Ainsi, nous avons exposé la complémentarité de plusieurs caractéristiques interfaciales pertinentes pour l'utilisation de polyplexes *in vivo*, améliorant ainsi la compréhension générale du façonnage de la surface de polyplexes avec un polyanion hydrophile.

Par la suite, nous avons envisagé la conception d'un **agent de transfection** comprenant le système E/Kcoil ainsi qu'un peptide cationique (RRRRRHHHHHC ou R5H5) directement greffés sur du dextrane. Cette approche a été développée dans le but de profiter du fait que plusieurs polypeptides étiquetés avec le peptide Ecoil avaient entretemps été développées dans nos groupes : l'un issu du facteur de croissance endothélial vasculaire (Ecoil-VEGF) et l'autre du peptide endosomolytique GALA (Ecoil-GALA). Deux conjugués dextrane-peptides ont ainsi été préparés et caractérisés en RMN-¹H : Dextrane-R5H5 et Dextrane-R5H5,-Kcoil. Leur capacité à

encapsuler d'ADN et à former des nanoparticules a été confirmée. Les essais cellulaires subséquents ont toutefois démontré que ces polyplexes ne présentaient pas d'avantage significatif par rapport aux contrôles utilisés : le Dextrane-R5H5 a permis de transfecter des cellules primaires (cellules endothéliales vasculaires ombilicales humaines HUVEC) dans le même ordre de grandeur que le PEI, sans avantage substantiel. De plus, en équipant nos polyplexes d'Ecoil-GALA, aucune différence n'a pu être observée au niveau de l'échappement endosomal, ou en termes d'expression de gène.

Dans une autre sous-étude, nous avons évalué l'utilisation de polyanions comme le **CMD** lors de la production de protéines recombinantes en bioréacteur par expression transitoire de gène. Nous avons observé que l'un des effets bénéfiques de l'enrobage des polyplexes cationiques par le CMD provenait du fait qu'il complexait l'excès de polycation utilisé. Cet excès de polycation a en effet été associé à la cytotoxicité du processus de transfection par polyplexe. Parallèlement, nous avons vérifié que l'utilisation directe de polyplexes enrobés diminuait à la fois le rendement en r-protéines ainsi que la toxicité associée à la procédure. Nous avons alors émis l'hypothèse qu'en ajoutant le polyanion après transfection, nous pourrions atténuer la cytotoxicité de l'excès de polycation tout en maintenant le taux de transfection, dans le but d'augmenter le rendement en r-protéine. Une collection de huit types de polyanions variés a été testée dans le but de vérifier cette hypothèse. Le délai entre transfection et ajout de polyanion a été exploré, ainsi que la quantité ajoutée, sans mettre en évidence l'effet attendu.

La dernière étude effectuée dans cette thèse a touché à l'**immunisation d'animaux par ADN** dans le cadre de la génération d'anticorps. Largement pratiqué sur de petits mammifères comme les souris, le procédé le plus utilisé actuellement est l'injection hydrodynamique d'ADN plasmidique seul, dont l'efficacité de délivrance de gènes est satisfaisante, toutefois le quart des animaux meurt des suites de cette procédure éprouvante. L'utilisation de polyplexes de type PEI/ADN est également très limitée de par une procédure encore plus risquée pour l'animal. Ces procédés comportent une injection systémique qui les rend difficilement adaptables aux animaux plus gros comme les lamas, un animal d'un intérêt particulier dans ce domaine. Nous avons donc commencé par mettre au point un protocole de lyophilisation de polyplexes enrobés à des fins d'immunisation de souris. Lyophiliser avec succès la préparation de nanoparticules nous a permis à la fois de concentrer la suspension à injecter à l'animal, ainsi que de séparer les étapes de préparation de la suspension et d'injection, qui étaient réalisées à deux endroits différents. Nous

nous sommes basés sur les résultats générés lors de notre étude de la chimiothèque de CMD afin de produire des préparations les moins éprouvantes possibles pour les animaux. Une première série d'injections intraveineuses de polyplexes enrobés au CMD70-60 a été effectuée sur des souris. Ces premiers résultats nous ont indiqué que l'expression de gènes résultante avait été trop faible, toutefois toutes les souris avaient récupéré de l'injection sans séquelles apparentes. Lors d'une seconde série d'essais, nous avons adapté le choix de CMD ainsi que la dose d'ADN ; et nous avons également testé l'administration sous-cutanée de polyplexes enrobés. L'emploi de CMD40-03 – plus apte à la délivrance de gènes *in vitro*, mais n'ayant pas validé les critères de compatibilité avec l'environnement physiologique – s'est alors soldé par la mort des souris en ayant reçu. En conclusion, ces essais *in vivo* n'ont pas conduit à l'élaboration d'une nouvelle procédure d'immunisation transférable à de plus gros animaux, toutefois ils attestent du pouvoir prédictif de notre étude *in vitro* systématique sur l'enrobage de polyplexes avec un polymère hydrophile anionique.

ABSTRACT

Gene vectorization has become an essential tool in the field of biotechnology. It is also found at the heart of research and development of gene therapies, a specific goal of which is to deliver genetic material in the nuclei of target cells. As the DNA to be delivered is fragile, most vectorization techniques include the use of nanoobjects that are able to encapsulate and protect this delicate cargo. These nanoobjects also facilitate gene transport to the nuclei of target cells whereby its expression can occur.

These nanovectors are made from varied materials that include polymers. Particularly, **polyplexes** form a class of nanovectors that derive from the complexation between DNA and a positively charged polymer. The works presented here are focused on the role of the interface between a model polyplex and the surrounding cellular and physiological environments during the process of gene delivery or transfection. More specifically, in the framework of oncology, systemic delivery has been investigated to enable polyplex accumulation in tumor tissue as well as in ensuing metastases. The stakes are twofold here: it is relevant to decorate polyplexes both with *ligands* that enable the specific targeting of cancer cells in order to deliver genes at the right place and with a complete *surface coating* enabling them to circulate more freely in the bloodstream while limiting their elimination by the mononuclear phagocyte system.

In a first study, we set up a **system to tether ligands at the surface of polyplexes**. We based our works on the E/Kcoil tandem: two peptides that enable a stable, oriented and specific tethering between two entities by auto assembly in solution. On the one side, we chose a ligand: a chimeric protein corresponding to the Ecoil peptide fused with the epidermal growth factor (Ecoil-EGF); and on the other side, we engineered a Kcoil peptide-decorated polyplex. In that endeavor, a cationic polymer – branched polyethylenimine (bPEI) – was functionalized with a moiety reactive to the Kcoil peptide. Polyplexes prepared with this activated bPEI could then be decorated at their surface by the covalent grafting of Kcoil. This system enabled us to fine-tune the ligand surface density in order to study its influence on polyplex uptake by cancer-derived EGF receptor (EGFR)-over-expressing A431 cells. Thus, we evidenced a switch effect between the EGFR-specific polyplex uptake rate by A431 cells and the amount of ligand on polyplexes.

Then, we carried out a second study that was focused on the electrostatic coating of polyplexes with carboxymethylated dextran (CMD). The objective was to draw relations between the coating structure – defined by the **charge density** and the **molecular weight** of the CMD used – and its function relative to the biological environment. We prepared and characterized a chemical library of 26 closely related CMDs by the controlled carboxymethylation of 4 dextrans differing by their molecular weight. A simple and robust electrostatic coating procedure was set up in order to carry out a systematic study of the CMD library. Each coated polyplex formulation was tested on decoupled relevant constituents of the physiological milieu: small ions, DNases, plasma proteins, red blood cells, and target cells. We observed monotonic trends between both parameters and DNA encapsulation. To our great surprise, those observations did not correlate with DNA protection against DNase challenging, the latter correlating with target cells reporter gene expression. Polyplex stability was evaluated at physiological salt concentration; the results of which indicated that both studied parameters had a jointed influence in preventing polyplex aggregation. At the surface of polyplexes, this influence translated in terms of steric and lateral stabilization rather than in terms of surface charge (zeta potential). Conversely, the latter turned out to be a strong predictor of the ability of coated polyplexes to prevent both opsonization and erythrocytes aggregation. Thus, we exposed the complementarity of several relevant interfacial characteristics for the use of polyplexes *in vivo*, whereby broadening our understanding of the tailoring of the surface of polyplexes with a hydrophilic polyanion.

Next, we envisioned the design of a **transfection agent** comprising of the E/Kcoil system together with a cationic peptide (RRRRRHHHHHC or R5H5) directly grafted on a dextran backbone. This approach was developed in order to take advantage of the growing collection of Ecoil-tagged polypeptides that were being developed and characterized in our group: especially one derived from the vascular endothelial growth factor (Ecoil-VEGF), and the other from the endosomolytic peptide GALA (Ecoil-GALA). In that endeavor, two dextran-peptides conjugates were prepared and characterized: Dextran-R5H5 and Dextran-R5H5,-Kcoil. Their abilities to encapsulate DNA and to form nanoparticles were confirmed. Subsequently, *in vitro* transfection assays demonstrated no significant gain from controls: Dextran-R5H5 could transfect cells with no greater efficacy than that of linear PEI. We then equipped our polyplexes with Ecoil-GALA in order to facilitate endosomal escape; however we could not evidence any additional gain regarding that latter point or with respect to overall reporter gene expression.

In another side study, we evaluated the **utility of polyanions such as CMD in transient gene expression (TGE) for the production of r-proteins in bioreactors**. We had previously observed that one of the beneficial effects of polyplex coating with CMD was related to the complexation of excess polycation, which had been linked to the cytotoxicity observed during polyplex-mediated transfection. In parallel, we confirmed that the direct use of coated polyplexes did reduce toxicity during transfection, albeit with decreased r-protein yield. We thus conjectured that the addition of polyanion after transfection could attenuate excess polycation-associated toxicity while maintaining high TGE yields, in order to increase the overall r-protein yield. A library of 8 varied polyanions was used in order to test this hypothesis. Although the delay before addition was explored along with the amount of polyanion, no reliable procedure could be brought out.

The last study that we carried out dealt with **DNA immunization of animals** for the generation of antibodies. The hydrodynamic injection of naked plasmid DNA is currently being used in that endeavor for small mammals such as mice. This procedure is effective yet not efficient as it proves lethal for one in four animals in our facility. The direct use of PEI/DNA polyplexes is also limited for it proves even riskier for the animal. These two techniques feature a systemic injection that renders them hardly scalable to larger animals such as llamas, a particularly relevant species in the field of antibodies generation. We first took on setting up a lyophilisation procedure for our most promising coated polyplex formulation for further use in mice. Successful lyophilizing enabled us to prepare in advance polyplexes to be rehydrated in a highly concentrated yet isotonic fashion that was better adapted for systemic injection. We selected appropriate formulations based on the knowledge gained from the analysis of our CMD library. A first assay was carried out with polyplexes coated with CMD70-60, the most stable formulation that was found to comply with every criterion for systemic injection. Corresponding results indicated that no lethal side effect arose, however the resulting gene expression in mice was undetectable. We then carried out a second round of injections on the same mice cohort, with two less stable formulations: a CMD 40-30 coating that still complied with every physiological criterion was chosen for systemic injection; and a CMD40-03 coating that featured better *in vitro* transfection performances but did not otherwise comply with every physiological criterion was injected subcutaneously. The subcutaneous injection proved lethal to every animal, which

suggests that our previous *in vitro* systematic analysis bears predictive power over *in vivo* performances.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	VI
ABSTRACT	X
TABLE DES MATIÈRES	XIV
LISTE DES TABLEAUX.....	XIX
LISTE DES BOITES	XIX
LISTE DES SCHÉMAS.....	XX
LISTE DES FIGURES.....	XXI
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XXV
LISTE DES ANNEXES.....	XXIX
AVANT-PROPOS	XXX
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
1.1 Biotechnologie	1
1.2 Délivrance de gènes <i>in vitro</i> : Les protéines recombinantes	2
1.3 Délivrance de gènes <i>in vivo</i>	4
1.3.1 La thérapie génique	4
1.3.2 L'immunisation par ADN	7
1.4 Objectif et structure de la thèse	10
CHAPITRE 2 : REVUE DE LITTÉRATURE	11
2.1 Préambule.....	11
2.2 La délivrance de gène.....	11

2.2.1	Problématique <i>in vitro</i> : Produire des r-protéines en bioréacteur.....	12
2.2.2	Problématique de la délivrance <i>in vivo</i>	14
2.3	Vectorisation de gène	17
2.3.1	Définitions	17
2.4	Le polyplexe	19
2.4.1	Caractère polyanionique de l'ADN.....	19
2.4.2	Les agents de polyplexation	21
2.4.3	Le polyéthylèneimine.....	22
2.5	Caractérisation et suivi des nanoparticules	24
2.5.1	Caractérisation biophysique	24
2.5.2	Suivi des nanoparticules <i>in vitro</i>	32
2.5.3	Nanoparticules et environnement biologique.....	39
2.6	ARTICLE 1 : Modification de la surface de nano-particules non virales pour améliorer la délivrance de gènes	41
2.7	Surface modification of non-viral nanocarriers for enhanced gene delivery	41
2.7.1	Abstract	42
2.7.2	Keywords	42
2.7.3	Introduction	42
2.7.4	The nanocarrier surface	44
2.7.5	Surface coating.....	47
2.7.6	Surface decoration.....	53
2.7.7	Design criteria for the tethering strategy	56
2.7.8	Combined surface modifications.....	59
2.7.9	Future perspectives.....	64
	Executive summary	66

2.7.10	Financial & competing interests disclosure	67
2.7.11	References	67
2.8	Le dextrane et ses dérivés.....	78
2.8.1	Le dextrane : biomatériau pionnier	78
2.8.2	La carboxyméthylation.....	79
2.8.3	Dextrane-vinylsulfone.....	81
2.9	La superhélice EK	83
CHAPITRE 3 : DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL.....		85
CHAPITRE 4 : ARTICLE 2 : IMMOBILISATION ORIENTÉE DE LIGAND PAR SUPERHÉLICE SUR DES NANOPARTICULES POUR LA DÉLIVRANCE CIBLÉE DE GÈNE		87
4.1	Présentation de l'article	87
4.2	A versatile coiled-coil tethering system for the oriented display of ligands on nanocarriers for targeted gene delivery	88
4.2.1	Abstract	88
4.2.2	Keywords	89
4.2.3	Introduction	89
4.2.4	Materials and Methods	92
4.2.5	Results	95
4.2.6	Discussion	104
4.2.7	Conclusion.....	106
4.2.8	Acknowledgments.....	107
4.2.9	Note	107
4.2.10	References	107

CHAPITRE 5 : ARTICLE 3 : FAÇONNAGE DE LA SURFACE D'UN VECTEUR DE DÉLIVRANCE DE GÈNES AVEC DU DEXTRANE CARBOXYMÉTHYLÉ : UNE ANALYSE SYSTÉMATIQUE.....	112
5.1 Présentation de l'article.....	112
5.2 Tailoring the surface of a gene delivery vector with carboxy-methylated dextran: a systematic analysis	113
5.2.1 Abstract	113
5.2.2 Keywords	114
5.2.3 Introduction	114
5.2.4 Materials and Methods	117
5.2.5 Results and discussion.....	122
5.2.6 Conclusion.....	137
5.2.7 Associated content.....	138
5.2.8 Author information.....	139
5.2.9 Acknowledgment	139
5.2.10 References	139
CHAPITRE 6 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES	145
6.1 Conjugués dextrane-peptides	145
6.1.1 Objectif.....	145
6.1.2 Résultats	145
6.1.3 Discussion	151
6.2 Immunisation de souris avec polyplexes enrobés	152
6.2.1 Objectif.....	152
6.2.2 Résultats	155
6.2.3 Discussion	164

DISCUSSION GÉNÉRALE	165
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	172
BIBLIOGRAPHIE	175
ANNEXES	194

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1 : Critères de conception pour les plateformes de nanoparticules pour la délivrance de gènes vers une tumeur.	15
Tableau 2-2 : Exemples d'excipients communément utilisés pour la lyophilisation de produits pharmaceutiques.....	17
Tableau 2-3 : Différents niveau d'évaluation du comportement des polyplexes avec les composants du sang.....	40
Table 2-4: Polymers used <i>in vivo</i> for the electrostatic coating of nucleic acid delivery vectors. \ominus represents the polyanions charge bearers.	49
Table 2-5: Range of interactions used in nanocarrier surface modification.	58
Table 2-6: Conflicting principles at stake for the decoration of PEGylated nanocarriers.	60
Table 5-1 : Characteristics of the 26 polymers forming our CMD library.	124
Table 5-2 : Multi-criteria evaluation of our CMD library for the coating of bPEI/pDNA polyplexes.....	138
Tableau 6-1 : Composition et tonicité résultante de la formulation du premier test <i>in vivo</i>	159
Tableau 6-2 : Caractéristiques des formulations du deuxième test <i>in vivo</i>	162
Tableau C-0-1 : Produits testés lors de l'étude d'ajout de polyanion post transfection.....	204

LISTE DES BOITES

Boite 1-1 : Définition par liste des techniques de biotechnologie.....	2
Boite 2-1 : Éléments à considérer pour le choix du mode de transfection à des fins de production de r-protéine.	13
Box 2-2: Key elements in the display of biomolecules on nanocarriers.	57
Box 2-3: Executive summary	66

LISTE DES SCHÉMAS

Schéma 1-1 : Attributs de l'immunisation et de la vaccination.	7
Schéma 1-2 : Obtention d'anticorps monoclonaux à partir de l'immunisation d'un animal avec un antigène ou avec le gène correspondant.	8
Schéma 1-3 : Représentation en blocs d'une Immunoglobuline G (IgG) et d'une IgG à chaîne lourde de camélidé.	9
Schéma 2-1 : L'expression transitoire de gènes par polyplexes appliquée à la production d'une protéine d'intérêt pour répondre à un besoin rapide de quantités modérées.	13
Schéma 2-2 : Lien phosphodiester entre deux bases azotées (B).	19
Schéma 2-3 : Multiples portails d'entrée des cellules mammaliennes.	20
Schéma 2-4 : Illustration des structures linéaire et branchée du polyéthylèneimine.	23
Schéma 2-5 : Diffusion dynamique de lumière appliquée à un échantillon en solution.	27
Schéma 2-6 : Structure d'une particule chargée, nature du potentiel zêta.	28
Schéma 2-7 : Principe de la NTA.	29
Schéma 2-8 : Concept de l'AF4.	32
Schéma 2-9 : Fragment représentatif de chaîne de dextrane.	78
Schéma 2-10 : Mécanisme de carboxyméthylation du dextrane.	79
Schéma 2-11 : Aperçu qualitatif de la réactivité de la fonction vinylsulfone dans l'eau.	81
Schéma 2-12 : Mécanisme réactionnel menant au dextrane-vinylsulfone.	81
Schéma 2-13 : L'interaction superhélice ou <i>coiled-coil</i> pour le tandem peptidique E/Kcoil.	84
Schéma 6-1 : Principe de formation de polyplexes à partir d'un hybride dextrane-peptides.	147
Schéma 6-2 : Avantage de l'injection intraveineuse (systémique) sur la sous-cutanée.	152
Schéma 6-3 : Aperçu de la réponse immunitaire suite à une immunisation par ADN ayant occasionné la transfection d'une cellule dendritique mature, ou l'endocytose d'antigènes recombinants par cette même cellule dendritique mature.	153
Schéma 6-4 : Importance du rôle du polycation en excès dans l'échappement endosomal.	169

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1 : La thérapie génique au niveau clinique dans le monde en juin 2015.....	4
Figure 2-1 : Exemple de traitement de lyophilisation.	16
Figure 2-2 : Exemples de gène et de vecteurs.....	18
Figure 2-3 : Échantillon de la variété et des architectures de nanoparticules pour la délivrance de gènes et leurs similitudes.....	20
Figure 2-4 : Exemple de chimiothèque combinatoire.	22
Figure 2-5: Effet d'éponge à protons.	24
Figure 2-6 : Exemple d'images de nanoparticules à base de PEI prises en microscopie non optique.....	25
Figure 2-7 : Électrophorèse sur gel d'agarose (AGE).....	31
Figure 2-8 : Exemples de double marquage de polyplexes permettant de distinguer le polycation des acides nucléiques.	33
Figure 2-9 : Spectres et filtres correspondant à l'usage de trois fluorophores sur un cytomètre en flux BD LSR II.	35
Figure 2-10 : Illustration de la microscopie confocale à fluorescence.....	37
Figure 2-11 : Exemples de résultats de cytométrie en flux.	38
Figure 2-12 : Exemples de micrographes de cellules transfectées réalisés par TEM.	38
Figure 2-13: Extracellular hurdles encountered along the systemic delivery of nanocarriers for the treatment of solid tumors.....	43
Figure 2-14: Intracellular hurdles along the delivery of plasmid DNA.	44
Figure 2-15: The different contributing structures of a nanocarrier surface.	45
Figure 2-16: Tumor-targeted siRNA delivery by a multi-functional nanocarrier.....	52
Figure 2-17: Effect of liposomal PEG coating and peptide EG-linker length on the cellular uptake of HER2-targeted liposomes in two HER2-overexpressing cell lines.	62
Figure 2-18 : Spectres ^1H -NMR représentatifs de dextrane et de CMD.	80

Figure 2-19 : Spectres ^1H -NMR représentatifs de dextrane et de Dextrane-VS.	82
Figure 4-1: Graphical abstract.	89
Figure 4-2: Schematic representation of coiled-coil mediated ligand immobilization strategy on nanocarriers.	91
Figure 4-3: Complexation behavior between PEI-PDP and plasmid DNA.	96
Figure 4-4: Biophysical characteristics of DNA/PEI-PDP complex suspension monitored over time with an N:P ratio of 5.5:1.	98
Figure 4-5: Synergistic effect of both receptor targeting and high positive surface charge on polyplex uptake.	99
Figure 4-6: Uptake kinetics of targeted polyplexes (empty squares) compared with that of positive control (filled squares) and negative control (empty circles).	100
Figure 4-7: Enhanced internalization of Ecoil-EGF decorated polyplexes requires EGFR internalization.	101
Figure 4-8 : Polyplex capture by A431 cells as monitored by fluorescence confocal microscopy.	102
Figure 4-9 : Polyplex-mediated gene expression.	103
Figure 5-1: Graphical abstract.	114
Figure 5-2 : Schematic molecular structure of CMD (top) and ^1H -NMR spectra of the 70 kDa CMD series (bottom).	123
Figure 5-3 : Dependence of the size (A) and charge (B) of polyplexes on the C:N:P ratio; representative scanning electron micrographs (SEM) of polyplexes at the C:N:P 3:6:1 ratio (C-E).	125
Figure 5-4 : Influence of CMD on encapsulated pDNA release from polyplexes.	127
Figure 5-5 : Influence of CMD on the ability of polyplexes to protect pDNA against DNase I.	128
Figure 5-6 : Influence of the charge density of CMD on the colloidal properties of polyplexes.	130

Figure 5-7 : Impact of CMD coating upon opsonization from plasma proteins (A) and its correlation with zeta potential (B).....	132
Figure 5-8 : Erythrocyte aggregation assay.....	134
Figure 5-9 : Transfection performances of coated polyplexes on A549 cells.....	135
Figure 5-10 : Illustration of polyplex binding to A549 with live confocal microscopy.	137
Figure 6-1 : L'interaction entre l'ADN et le peptide Kcoil.....	146
Figure 6-2 : Caractérisation RMN- ¹ H du dextrane et des conjugués préparés.	148
Figure 6-3 : Caractérisation physique des polyplexes Dextrane-R5H5/ADNp.	149
Figure 6-4 : Test de protection contre la DNase I.	149
Figure 6-5 : Condensation de l'ADNp par le Dextrane-R5H5,-Kcoil.	150
Figure 6-6 : Conception, production et purification de la r-protéine Ecoil-GALA.	151
Figure 6-7 : Suivi de polyplexes enrobés par DLS durant un mois en absence de sels à concentration physiologique (gauche) ou en leur présence (droite).	156
Figure 6-8 : Suivi de polyplexes enrobés au CMD70-60 dans le tampon HBG.	157
Figure 6-9 : Caractérisation physique des polyplexes enrobés au CMD70-60 pour le premier essai <i>in vivo</i>	160
Figure 6-10 : Vérification des performances de transfection <i>in vitro</i> de polyplexes enrobés au CMD70-60 ayant subi la lyophilisation puis une réhydratation concentrée.	160
Figure 6-11 : Suivi de polyplexes enrobés au CMD40-03 dans le tampon HBG.	161
Figure 6-12 : Vérification des performances de transfection <i>in vitro</i> des formulations B et D ayant subi la lyophilisation puis une réhydratation concentrée.	163
Supplemental Figure A-0-1: DLS characterization of bPEI/CMD70-30 polyplexes.	195
Supplemental Figure A-0-2: Correlations between smeared pDNA and CMD charge density (A), and between degraded pDNA and smeared pDNA (B).	196
Supplemental Figure A-0-3: Close-up on the influence of CMD on the ability of polyplexes to protect pDNA against DNase I.....	197

Supplemental Figure A-0-4: Detailed plots of aggregation kinetics for each CMD series.....	198
Supplemental Figure A-0-5: Representative images of erythrocyte aggregation (squared panels) in presence of each polyplex formulation.	199
Supplemental Figure A-0-6: Titration of Ecoil-EGF by CMD70-30-Kcoil monitored by HPLC.	199
Figure C-0-7 : Performances de polyplexes bPEI/ADNp avec (centre) ou sans enrobage au CMD70-60 (haut) pour la transfection de HEK293 6E et caractéristiques physiques des polyplexes enrobés (bas)..	203
Figure C-0-8 : Structure des polyanions ajoutés après transfection.....	205
Figure C-0-9 : Résultat préliminaire (n=1) sur l'effet de la neutralisation du PEI en excès après transfection.	207
Figure C-0-10 : Influence du délai avant l'addition de polyanion CMD70-60 (n=1) à une de culture de cellules HEK293-6E transfectées avec du PEIpro.	208
Figure C-0-11 : Impact du type de polyanion ajouté 1 h après transfection.	209
Figure C-0-12 : Contribution à l'ETG de l'ADNp ajouté après transfection.....	209

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Par souci d'uniformité entre les sections en anglais et en français, les sigles anglais seront utilisés tout au long du document. Les traductions non transparentes sont indiquées ici.

ADNp	ADN plasmidique
AF4	fractionnement par couplage flux-force par filtration asymétrique
AFM	microscopie à force atomique
AGE	électrophorèse sur gel d'agarose
AGU	unité anhydroglucose
AUC	ultracentrifugeuse analytique
BFP	protéine fluorescente bleue
bp	paire de bases, unité de longueur d'acides nucléiques
bPEI	polyéthylènimine branché
CD	densité de charge
CMD	dextrane carboxyméthylé
C:N:P	rapport molaire entre les acides carboxyliques du CMD, les amines du polycation et les phosphates de l'ADN pour une formulation de polyplexes enrobés
Da	dalton, unité de masse molaire utilisée pour les polymères égale au g/mol
d_{CM}	degré de carboxyméthylation
DLS	<i>dynamic light scattering</i> , diffusion dynamique de lumière
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> , un milieu basal de culture
DNase	désoxyribonucléase
D ₂ O	oxyde de deutérium
dpt	<i>day post transfection</i> , jour post transfection
DTT	dithiothréitol

DVS	divinylsulfone
d _{VS}	degré de fonctionnalisation vinylsulfone
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
EC ₅₀	concentration effective médiane
Ecoil-EGF	EGF étiqueté avec un peptide Ecoil en N-terminal
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , facteur de croissance épidermique
EGFR	un des récepteurs de l'EGF, encore désigné sous le nom d'erbB1 ou HER1
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , dosage immuno-enzymatique sur support solide
EPR	<i>enhanced permeation and retention</i> , rétention et perméabilité accrues
EtBr	bromure d'éthidium, marqueur fluorescent intercalant d'acide nucléique
ETG	expression transitoire de gène
FCS	<i>fetal calf serum</i> , sérum fœtal de veau
FDA	<i>food and drug administration</i> , agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
FRET	transfert d'énergie par résonance de Förster
GelRed™	marqueur fluorescent intercalant d'acide nucléique
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , protéine fluorescence verte
HEK293	<i>human embryonic kidney</i> , famille de lignées cellulaires mammaliennes utilisées en biotechnologie pour la production de protéines recombinantes
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
¹ H-NMR	résonance magnétique nucléaire du proton
hpt	heure post transfection
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , peroxydase de raifort

HUVEC	<i>human umbilical vascular endothelial cell line</i> , lignée de cellules endothéliales vasculaires ombilicales humaines
IgG	Immunoglobuline G
jpt	jour post transfection
LC-SPDP	(<i>long chain</i>) N-Succinimidyl-6-[3-(2-pyridyldithio)-propionamido]hexanoate
IPEI	polyéthylèneimine linéaire
M	molaire, unité égale au mol/L
mpt	minute post transfection
mRFP	protéine fluorescente rouge monomérique
NHS	N-hydroxysuccinimide
N:P	rapport molaire entre les amines du polycation et les phosphates de l'ADN pour une formulation de polyplexes
NTA	analyse de nanoparticules par leur trajectoire
OPSS	<i>ortho</i> -pyridyldisulfure
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , tampon phosphate isotonique
PdI	indice de polydispersité
pDNA	ADN plasmidique
PEG	polyéthylène glycol
ppm	partie par million
PVP	polyvinylpyrrolidone
r-protéine	protéine recombinante
SDS	dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec du SDS
SEAP	phosphatase alcaline embryonnaire sécrétée
SEM	<i>scanning electron microscopy</i> , microscopie électronique à balayage

SLS	<i>static light scattering</i> , diffusion statique de la lumière
TCEP	Tris(2-carboxyéthyl)phosphine
TEM	microscopie électronique à transmission
TNBS	acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique
w/v	<i>weight-to-volume ratio</i> , rapport masse sur volume
w/w	<i>weight-to-weight ratio</i> , rapport massique
YOYO [®] -1	marqueur fluorescent intercalant d'acide nucléique

LISTE DES ANNEXES

Annexe A – Données supplémentaires du Chapitre 5	194
Annexe B – Preparation of dextran-vinylsulfone.....	200
Annexe C – Addition de polyanion post transfection	202

AVANT-PROPOS

Ce projet est issu du partenariat entre deux laboratoires aux expertises et infrastructures bien différentes. Cette collaboration avait été préalablement établie dans le cadre d'un précédent projet de doctorat relevant de la chimie de surface d'un côté et de biotechnologie de l'autre. Il s'agit des travaux de Cyril Boucher sur l'immobilisation orientée de protéines recombinantes (r-protéines) dans le cadre du génie tissulaire. Les deux laboratoires ont toujours continué à collaborer à la faveur de nouvelles idées dont celles reliées au projet dont il est question dans cette thèse. Au départ calibré pour une maîtrise recherche, ce dernier a été par la suite étoffé avec le volet dextrane carboxyméthylé à l'occasion d'un passage direct vers le doctorat.

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Biotechnologie

La biotechnologie au sens large n'est pas un domaine si récent parmi les sciences et techniques. Elle inclut des procédés anciens et traditionnels comme la fermentation qui la place au cœur de la manufacture du pain, du vin et du fromage. L'organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) définit la biotechnologie selon la définition unitaire suivante (OCDE, 2005) :

« L'application de la science et de la technologie à des organismes vivants, de même qu'à ses composantes, produits et modélisations, pour modifier des matériaux vivants ou non-vivants aux fins de la production de connaissances, de biens et de services. »

La seconde moitié du XX^e siècle a vu naître puis se développer une série d'applications nouvelles de la biotechnologie suite aux découvertes sur l'ADN et sur la génétique. La pluralité de la biotechnologie contemporaine est bien décrite par la seconde définition – sous forme de liste – qu'en donne l'OCDE. Cette définition par liste est reportée Boite 1-1. Dans ce cadre, l'avancement de la recherche a permis une meilleure compréhension de la nature des protéines ainsi que leur relation avec le code génétique. Il n'a ensuite fallu que quelques années avant que les premières protéines issues des nouvelles biotechnologies – dites protéines recombinantes (r-protéines) – deviennent accessibles aux patients, l'insuline en tête en 1982¹. Plus récemment, avec une part de marché d'environ 63.4 milliards d'USD pour l'année 2013, et un taux de croissance annuel moyen estimé à 12.2% jusqu'à 2019, l'exemple des anticorps monoclonaux illustre bien l'énorme impact qu'a maintenant la biotechnologie pour la santé².

¹ Source : Genentech Inc (<http://www.gene.com/media/company-information/chronology>)

² Source : BCC Research, rapport de janvier 2015 intitulé « anticorps thérapeutiques : technologies et marchés mondiaux » (<http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/antibody-drugs-market-bio016j.html>)

Boîte 1-1 : Définition par liste des techniques de biotechnologie. (OCDE, 2005)

- **ADN/ARN** : génomique, pharmacogénomique, sondes géniques, génie génétique, détermination de séquences/synthèse/amplification de l'ADN/ARN, profil de l'expression génique et utilisation de la technologie antisens.
- **Protéines et autres molécules** : détermination de séquences/synthèse/ingénierie des protéines et peptides (y compris les hormones peptidiques) ; amélioration des méthodes d'administration des médicaments de masse molaire moléculaire élevée ; protéomique, isolement et purification des protéines, signalisation, identification des récepteurs cellulaires.
- **Culture et ingénierie des cellules et des tissus** : culture de cellules/tissus, génie tissulaire (y compris les structures d'échafaudage tissulaires et le génie biomédical), fusion cellulaire, vaccins/stimulants immunitaires, manipulation embryonnaire.
- **Techniques biotechnologiques des procédés** : fermentation au moyen de bioréacteurs, procédés biotechnologiques, lixiviation biologique, pulpation biologique, blanchiment biologique, désulfuration biologique, biorestauration, biofiltration et phytorestauration.
- **Vecteurs de gènes et d'ARN** : thérapie génique, vecteurs viraux.
- **Bioinformatique** : construction de bases de données sur les génomes, les séquences de protéines ; modélisation de procédés biologiques complexes, y compris les systèmes biologiques.
- **Nanobiotechnologie** : applique les outils et procédés de nano/microfabrication afin de construire des dispositifs permettant d'étudier les biosystèmes, avec des applications dans l'administration des médicaments, des diagnostics, *etc.*

Les travaux présentés dans cette thèse s'inscrivent dans l'exploration de possibilités nouvelles offertes par ces techniques toujours plus diverses et pluridisciplinaires – en particulier les vecteurs de gènes et la nanobiotechnologie – avec pour contexte spécifique la lutte contre le cancer.

1.2 Délivrance de gènes *in vitro* : Les protéines recombinantes

Par définition, une protéine recombinante (r-protéine) provient de l'expression d'un gène artificiellement introduit dans un organisme. Le concept de **délivrance de gènes** est donc à la base de toute application des r-protéines.

À l'échelle de la culture de cellule, la vectorisation de gènes pour l'expression de r-protéines est un outil dont l'usage s'est généralisé depuis des décennies. Son usage confiné *in vitro* et dans des bioréacteurs a permis une formidable expansion de nos connaissances dans le fonctionnement des cellules, dans des domaines telles que les sciences omiques. Elle est également intimement liée à l'émergence de la nouvelle génération de thérapies à base de r-

protéines. En effet, les protéines sont des molécules trop complexes pour pouvoir être obtenues en quantités suffisantes par la chimie organique conventionnelle. Il est nécessaire de procéder par biosynthèse, c'est-à-dire d'exploiter de la biomasse produisant la r-protéine d'intérêt. Cette biomasse peut être cultivée dans un bioréacteur, par exemple pour une culture de cellules procaryotes comme des bactéries, voire une culture de cellules mammaliennes d'origine humaine. La problématique autour ce bioprocédé est développée section 2.2.1.

On peut également exploiter des organismes complexes génétiquement modifiés comme des plantes ou des animaux pour produire des r-protéines. Un exemple récent a été très médiatisé lors du développement de l'épidémie de maladie à virus Ébola en Afrique de l'Ouest en 2014 : Le ZMapp. Ce médicament à base d'anticorps monoclonaux est manufacturé dans des plants de tabac.³ Autre exemple, l'ATryn – de l'antithrombine recombinante indiquée pour la prévention de thromboembolisme chez les patients à la déficience héréditaire en antithrombine – est produite dans le lait de chèvres génétiquement modifiées.⁴

Pour le cas du ZMapp, des plants de tabac sont infectés avec des virus reprogrammés contenant le matériel génétique permettant l'expression des anticorps monoclonaux; c'est donc bien un exemple de délivrance de gènes. En revanche, les chèvres génétiquement modifiées que nous venons de mentionner n'impliquent pas de la délivrance de gènes *in vivo*, puisque ce sont les embryons de chèvres qui sont modifiés *in vitro*.

Dans les deux sous-sections suivantes seront présentés deux besoins d'ampleur qui ont motivé le développement de la délivrance de gènes *in vivo* : la thérapie génique en général, et le cas de l'immunisation par ADN.

³ Source : Zachary Brennan, 6 août 2014, BioPharma Reporter <http://www.biopharma-reporter.com/Bio-Developments/Kentucky-firm-ramps-production-of-plant-based-antibodies-for-Ebola>)

⁴ Source : rEVO Biologics Inc. (<http://www.atryn.com/recombinant.php>)

1.3 Délivrance de gènes *in vivo*

1.3.1 La thérapie génique

L'exploitation d'organismes vivants à des fins de production industrielle de protéines thérapeutiques est généralement bien acceptée. Toutefois, les applications de vectorisation de gènes touchant directement aux organismes complexes – plantes, animaux dont humains – sont plus controversées et posent des questions d'éthiques complexes. Ces applications incluent par exemple les organismes génétiquement modifiés pour l'agro-alimentaire, ainsi qu'un éventail très ouvert d'applications pour la santé regroupées sous le terme de *thérapie génique*. Quelques statistiques sur les thérapies géniques en phase d'essais cliniques sont reportées Figure 1-1; elles illustrent la variété des nombreux efforts dédiés à en faire une alternative concrète aux limitations des thérapies actuelles.

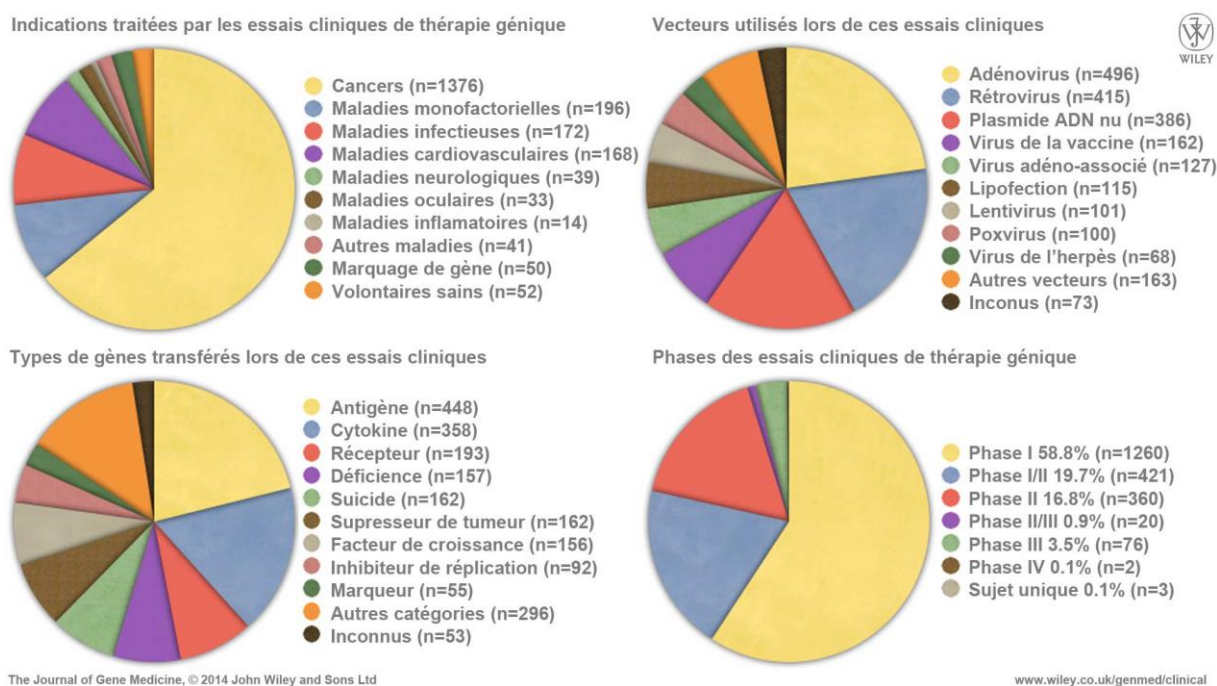


Figure 1-1 : La thérapie génique au niveau clinique dans le monde en juin 2015⁵.

⁵ Source : Michael Edelstein, juin 2015, John Wiley and Sons, (www.wiley.co.uk/genmed/clinical)

Sans entrer dans le détail, plusieurs faits saillants permettent une mise en contexte des travaux de cette thèse :

1. Sur plus de deux mille essais cliniques de thérapie génique, près des deux tiers concernent des cancers ;
2. Peu de vecteurs **non viraux** à base de polymères sont arrivés au stade clinique (ils n'ont pas de catégorie propre sur ces graphiques) (Yin et al., 2014), ce qui donne une idée des efforts restants à fournir afin d'en améliorer leurs performances et de mieux les caractériser ;
3. La plupart des gènes utilisés ont pour cible les cellules malades du patient (par exemple un gène de déficience à exprimer dans des cellules où celui-ci manque, un gène de suicide ou d'inhibiteur de réplication à exprimer dans des cellules à éradiquer) et/ou proches du tissu malade (gènes exprimant antigènes ou cytokines afin d'aider l'organisme à identifier le site des cellules à éradiquer), **ce qui implique de cibler l'expression du gène dans certains tissus**;
4. Les essais cliniques de phase I – étudiant la sécurité de l'agent thérapeutique pour le patient – présentent un faible taux de succès, et ceux de phase II – étudiant l'efficacité de la thérapie – ont un taux de succès encore plus faible.

Pour revenir sur le 2^{ème} point, les vecteurs viraux sont effectivement les acteurs principaux de la vectorisation de gènes en thérapie génique. L'évolution les a dotés d'extraordinaires capacités à amener du matériel génétique à s'exprimer dans des cellules hôtes, ce qui en fait naturellement d'excellents candidats. Brièvement, les principales limitations qui leur sont inhérentes ont été clairement identifiées :

- risques de carcinogenèse ;
- immunogénicité ;
- tropisme large (risque de toucher des tissus sains non ciblés) ;
- capacité d'embarquement d'ADN limitée ;
- difficultés de production des vecteurs viraux. (Yin et al., 2014)

Dépasser ces limitations continue de faire l'objet de grands efforts qui font que la première thérapie génique accessible aux patients est en train d'être commercialisée en Europe : Le Glybera[®] est une thérapie génique basée sur un virus adéno-associé destiné à des patients souffrant d'hyperlipoprotéïnémie familiale, une maladie marquée par une déficience en enzyme protéine lipase d'origine génétique⁶. Le coût du traitement est estimé à 1.2 million d'euros, soit *ca.* 1.7 million de dollars⁷.

Toutefois, l'extrême diversité des applications thérapeutiques potentielles rend le développement de vecteurs non viraux tout aussi pertinent. En effet, malgré leur faible efficacité par rapport aux virus, ils présentent les avantages principaux suivants :

- plus faible immunogénicité que les vecteurs viraux ;
- pas d'immunité préexistante possible chez le patient ;
- plus grande capacité d'embarquement d'ADN ;
- plus faciles à produire et donc potentiellement bien moins coûteux. (Yin et al., 2014)

Notons à ce stade que l'on parlera de **transfection** (mot-valise entre transformation et infection) pour désigner le procédé par lequel un gène est inséré dans les cellules d'intérêt au moyen d'un vecteur non viral. Ainsi, un vecteur de transfection idéal n'a pas une identité unique mais va dépendre fortement de l'application visée. Il devra alors être spécifique au tissu ciblé et être capable de transporter son cargo intact et en quantités suffisantes pour avoir l'effet thérapeutique désiré. Cela implique de valider de nombreux critères spécifiques combinés – par exemple en termes de dimensions et de propriétés de surface – tout en étant entre autres simple à manufacturer, peu coûteux et facile à distribuer. Toutefois, à des fins de développement et d'optimisation, des vecteurs modèles aux limites pré-existantes doivent quand même être utilisés afin d'avancer vers ce vecteur idéal par expérimentation.

⁶ Source : uniQure N. V., communiqué de presse, 4 août 2014 (<http://www.uniqure.com/news/204/182/Chiesi-and-uniQure-Provide-Update-on-Glybera-Launch.html>)

⁷ Source : Ben Hirschler, Reuters, communiqué de presse, 2 novembre 2012 (<http://uk.reuters.com/article/2012/11/02/us-genetherapy-europe-idUKBRE8A10K520121102>)

1.3.2 L'immunisation par ADN

Si le terme immunisation évoque celui de vaccination, cette dernière ne constitue qu'une application parmi d'autres (voir **Schéma 1-1**).

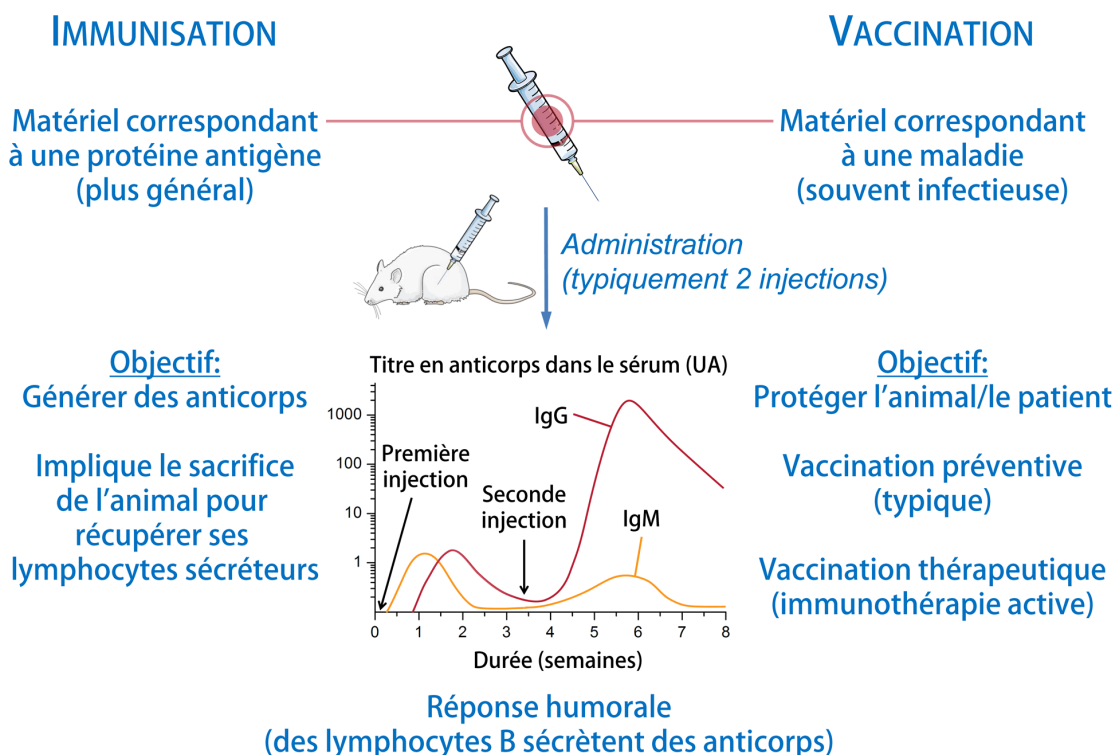


Schéma 1-1 : Attributs de l'immunisation et de la vaccination.

La vaccination est usuellement employée pour prévenir l'occurrence d'une maladie infectieuse causée par un pathogène. Plus subtilement, elle peut également être employée lorsque le patient a déjà contracté une maladie non infectieuse, et que son organisme ne parvient pas à mettre en place des défenses immunitaires contre celle-ci. Ce cas de figure inclue plusieurs types de cancers (Nguyen, Green, Chan, Langer, & Anderson, 2009). Une troisième application est la **génération d'anticorps**. Cette application est atypique dans le sens où elle n'est pas thérapeutique ; elle ne constitue pas un traitement contre une maladie ou un trouble, mais plutôt un outil. On l'emploie pour obtenir des anticorps générés par le système immunitaire de l'organisme animal visé, voir Schéma 1-2.

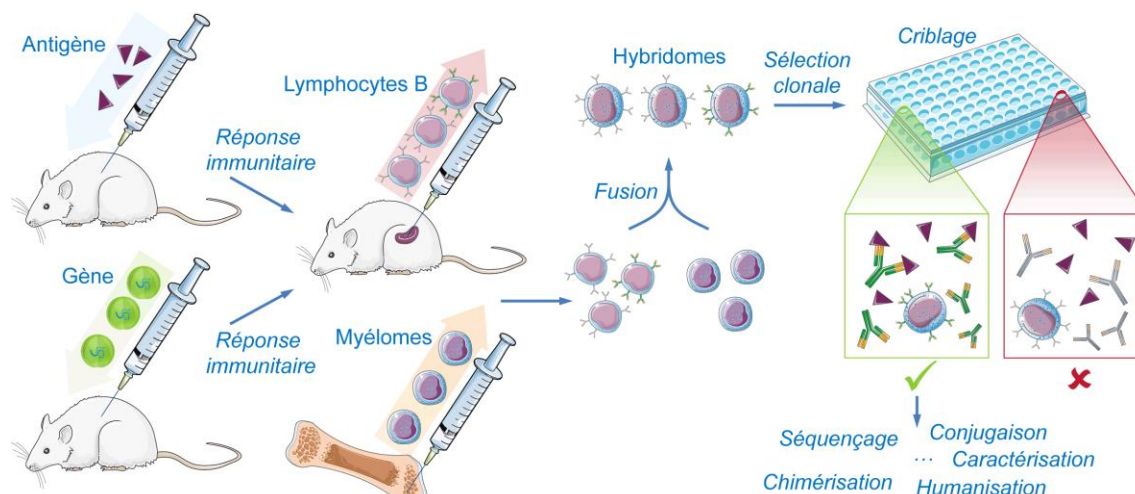


Schéma 1-2 : Obtention d'anticorps monoclonaux à partir de l'immunisation d'un animal avec un antigène ou avec le gène correspondant. Suite à la réponse immunitaire de l'animal, des lymphocytes B sont extraits de sa rate, puis sont fusionnés avec des cellules de myélome immortalisées. Après sélection des hybridomes, ceux-ci sont testés pour l'affinité de leurs anticorps avec l'antigène. Les meilleurs clones cellulaires vont sécréter des anticorps monoclonaux qui vont par la suite être testés entre autres pour leur spécificité.

Pour rappel, l'immunisation conventionnelle est basée sur l'injection d'un *antigène* dans l'organisme visé. Cet antigène va présenter des marqueurs correspondant à un pathogène, sans en avoir l'infectivité, permettant aux cellules du système immunitaire de se constituer un système de défense contre le pathogène. Cela passe en particulier par la fabrication d'anticorps spécifiques à cet antigène : c'est la réponse humorale. **L'immunisation par ADN** est donc fortement apparentée à la **vaccination par ADN**. La différence entre les deux est qu'un vaccin est prophylactique, alors que l'immunisation qui nous intéresse ici sert uniquement à obtenir des anticorps spécifiques à l'antigène en question. Cet antigène peut ainsi n'avoir aucun rapport avec une maladie infectieuse. Le point commun de vaccination par ADN et immunisation par ADN est de requérir le gène de l'antigène, et non ce dernier en tant que tel.

Plusieurs raisons peuvent justifier l'emploi de l'immunisation par ADN et non par antigène : par exemple si l'antigène considéré est peu stable, difficile à obtenir en quantités adaptées à l'immunisation, ou encore si l'antigène doit être présenté sous une certaine conformation dans l'organisme, comme par exemple en tant que protéine transmembranaire (Yves Durocher, communication personnelle, octobre 2014), ou encore présentant des

modifications post-traductionnelles comme l'hyperphosphorylation (Herweijer & Wolff, 2006). En outre, les quantités d'antigène nécessaires, voire les quantités de d'ADN plasmidique elles-mêmes, deviennent prohibitives quand l'organisme à immuniser est gros. La famille des camélidés – dont les lamas et les dromadaires sont des représentants – est un bon exemple: ces animaux présentent un intérêt particulier de ce champ d'application. En bref, ils peuvent générer des immunoglobulines G (IgG) sans chaîne légère dans leur partie variable (Muyldermans, 2001), voir Schéma 1-3. Ce format d'IgG est un excellent précurseur pour la conception d'anticorps à domaine unique, à la fois très spécifiques et bien plus petits que les anticorps conventionnels.

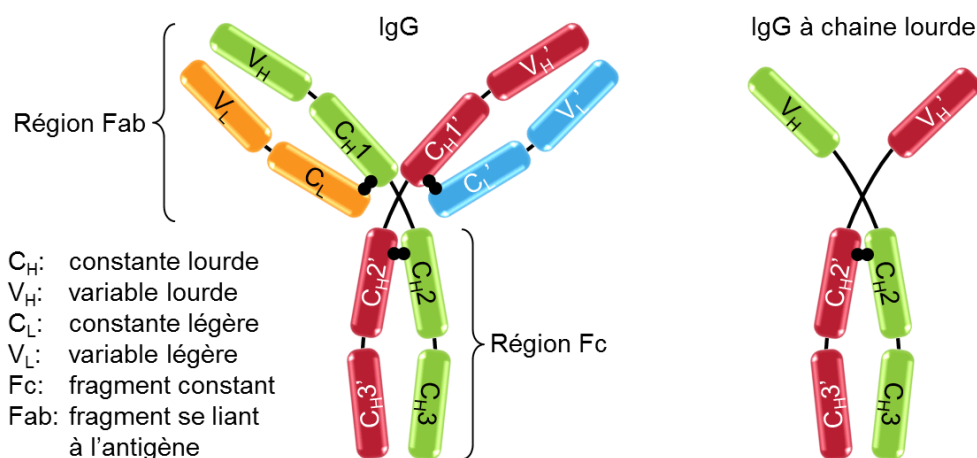


Schéma 1-3 : Représentation en blocs d'une Immunoglobuline G (IgG) et d'une IgG à chaîne lourde de camélide.

Il y a toujours possibilité d'immuniser ces gros animaux avec de l'ADN seul, mais avec une efficacité limitée et un coût relativement élevé. Pour le cas d'une vaccination à ADN, le problème se pose moins puisqu'il devient possible d'employer des méthodes de production d'ADN de masse car c'est toujours la même séquence d'ADN qui est utilisée. C'est le cas par exemple pour le vaccin ADN contre le virus du Nil occidental destiné aux chevaux⁸. Pour les cas recourant à l'usage d'ADN variés comme pour l'obtention d'anticorps d'intérêt thérapeutique, il devient d'un grand intérêt de générer une formulation de nanoparticules de délivrance de gène. De plus, les procédés d'immunisation par ADN seul restent difficiles à mettre en œuvre ou

⁸ Source : Centre pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC), Communiqué de presse, 18 juillet 2005 (<http://web.archive.org/web/20070701212416/http://cdc.gov/od/oc/media/pressrel/r050718.htm>)

entraînent un taux de mortalité élevé chez les animaux utilisés (Anne Marcil, communication personnelle, février 2015).

1.4 Objectif et structure de la thèse

Les travaux que nous présentons ici peuvent être regroupés sous la problématique générale suivante : *Que peut-on faire au niveau de la surface des polyplexes pour améliorer leurs performances de délivrance de gène?*

Tout d'abord, durant cette thèse nous avons eu l'opportunité de produire un article de revue – inclus dans le **Chapitre 2** – traitant des modifications de surface de nanoparticules pour améliorer la délivrance de gène, ce qui nous a apporté un point de vue étendu en la matière.

Nous avons également dégagé des angles d'attaque plus précis pour réaliser nos travaux expérimentaux :

- Comment modifier la surface de polyplexes sans en modifier le cœur?
- Faut-il ajuster ponctuellement la surface, ou bien la redéfinir intégralement?

Nous nous sommes attachés à expérimenter sur ces questions en explorant deux pistes de réponse concrètes. Premièrement, nous avons décoré la surface de polyplexes au moyen d'un système d'immobilisation orientée de protéines recombinantes. Ces résultats sont reportés au **Chapitre 4**. Ensuite, nous avons étudié l'enrobage électrostatique de polyplexes au moyen d'une chimiothèque de polymères. Ces résultats constituent le **Chapitre 5**. Suite aux résultats acquis lors de ces études, trois projets secondaires (rapportés au **Chapitre 6 et en Annexe C**) ont été menés en tentant de répondre aux questions suivantes :

- Peut-on préparer un agent de transfection autonome mettant à profit notre système d'attache orienté?
- Notre agent d'enrobage de polyplexes permet-il de diminuer la cytotoxicité associée à la transfection en bioréacteur pour améliorer la productivité en r-protéines?
- Nos polyplexes enrobés permettent-ils d'améliorer l'immunisation d'animaux à des fins de génération d'anticorps?

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

Read not to contradict, nor to believe, but to weigh and consider.

Sir Francis Bacon, 1625 (in *Essays*, 29. *Of studies*)⁹

2.1 Préambule

Le début de ce chapitre introduit les éléments nécessaires à la bonne compréhension de ces travaux : la délivrance de gène, les vecteurs non viraux à base de polymères, et les techniques de caractérisation de telles nanoparticules.

L'article de revue réalisé durant ce projet est présenté en section 2.6 et est reporté en section 2.7 de ce chapitre. Il traite des stratégies de modification de surface de nanoparticules organiques dont il est question dans ces travaux. Le point de vue de ce texte est résolument généraliste afin d'être adapté à un lectorat pluridisciplinaire varié.

Enfin, les polymères préparés dans ces travaux ainsi que le tandem peptidique E/K seront présentés en dernières sections.

2.2 La délivrance de gène

Le principe de délivrance de gènes est le suivant : il s'agit de transporter un morceau d'ADN fabriqué en laboratoire jusque dans le noyau de cellules visées, pour que celles-ci expriment le gène codé par l'ADN. Conceptuellement, si on ne vise qu'une seule cellule isolée sous un microscope, il reste facile de s'imaginer une micro-aiguille injecter l'ADN directement

⁹ Source : (<https://archive.org/stream/essaiesofsrfranc00baco#page/100/mode/2up/search/of+studies>)

dans le noyau. Maintenant, les cas concrets sont souvent d'une autre nature. Deux cas de figure vont nous préoccuper : il va s'agir soit d'une culture de cellules que l'on souhaite **transfecter** en intégralité; soit d'un organisme complexe dans lequel un type cellulaire dans un tissu spécifique va être visé.

Une première série de barrières est donc dressée sur le chemin des vecteurs de gènes : les barrières intracellulaires qui vont limiter l'accès au noyau depuis d'environnement extracellulaire. (Ce point est détaillé section 2.7.3)

2.2.1 Problématique *in vitro* : Produire des r-protéines en bioréacteur

Voyons premièrement la problématique liée à l'expression transitoire de gènes pour la production de protéines recombinantes (r-protéines) en bioréacteur. Ici, le cadre est résolument *in vitro*. Il va s'agir de transfecter une culture de cellules dans un bioréacteur aux conditions contrôlées. Les cellules utilisées sont issues de lignées spécifiquement optimisées pour être faciles à transfecter et pour produire des glycoprotéines propres à l'utilisation préclinique et clinique. Des efforts continuels sont faits pour augmenter la productivité du procédé. Cela passe par des améliorations à de nombreux niveaux : de la formulation des milieux de culture à la purification de la r-protéine, en passant par le mode de transfection lui-même (Durocher & Butler, 2009). Une méthode d'expression typique est illustrée Schéma 2-1.

Typiquement, la culture de cellules est amplifiée jusqu'à un volume désiré. Une fois que la concentration cellulaire optimale pour la transfection est atteinte, une préparation de vecteurs de gènes est préparée et immédiatement utilisée. La culture ainsi transfectée sera maintenue quelques jours voire une ou deux semaines dans le but de produire un titre élevé en r-protéines. Durant cette période, plusieurs additifs peuvent être envisagés : agents inducteurs et/ou stimulants de la biosynthèse de protéine, nutriments, ajusteurs de tonicité, ajusteurs de pH, *etc.* (Geisse, 2009).

Dans ce cadre, la transfection peut s'opérer selon des modalités très diversifiées, loin des limites imposées dans un contexte *in vivo*. Nous n'aborderons pas ici l'ensemble des méthodes utilisées, toutefois, les considérations majeures quant au choix du mode de transfection sont rappelées dans la Boite 2-1.

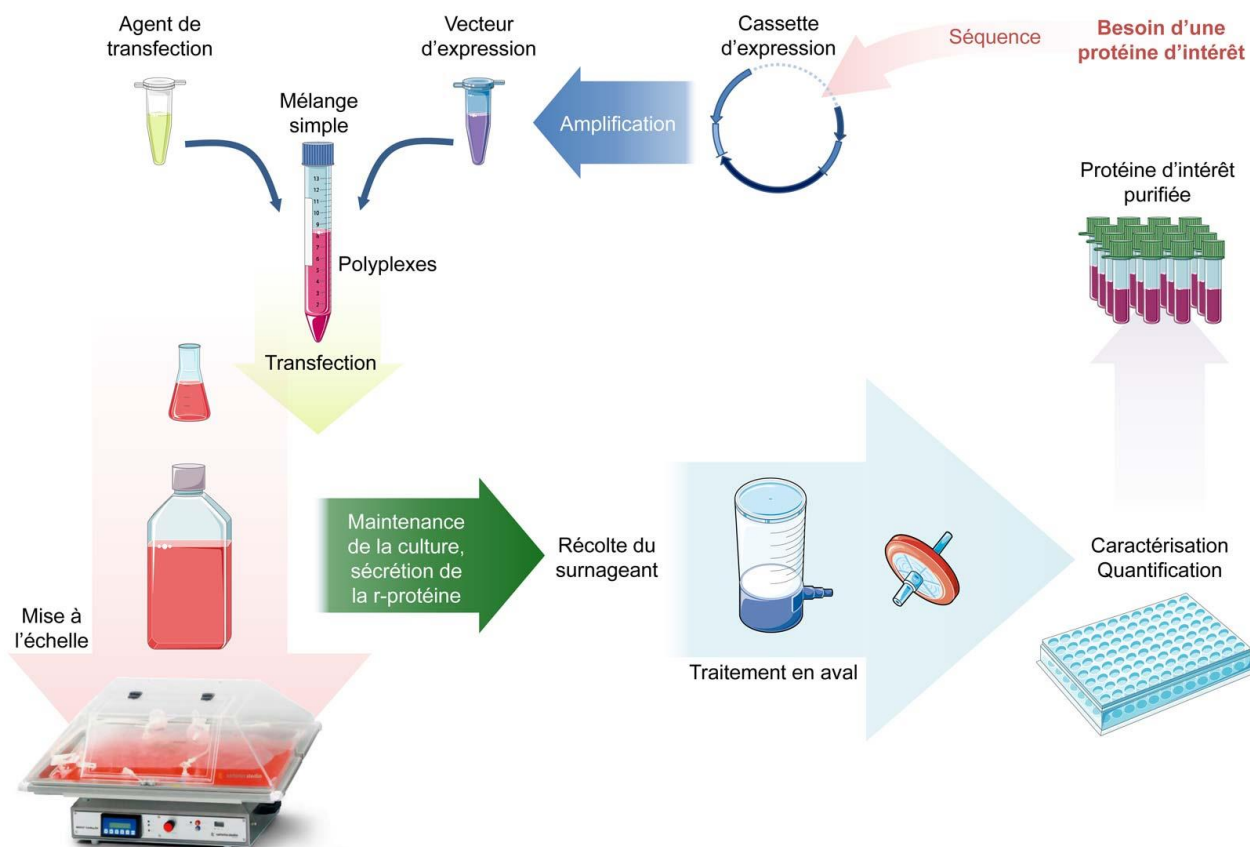


Schéma 2-1 : L'expression transitoire de gènes par polyplexes appliquée à la production d'une protéine d'intérêt pour répondre à un besoin rapide de quantités modérées.

Boite 2-1 : Éléments à considérer pour le choix du mode de transfection à des fins de production de r-protéine.

Maximiser

- Le taux de cellules transfectées
- Le nombre de copies de gène d'intérêt exprimées par cellule

Minimiser

- Le coût des agents de transfection
- Les quantités d'agents de transfection
- Les quantités d'ADN d'intérêt
- La cytotoxicité causant le mort cellulaire
- La cytotoxicité causant le ralentissement de la biosynthèse de protéines
- L'interaction avec le traitement en aval du produit

Ce contexte de transfection en bioréacteur est favorable à l'utilisation de vecteurs non viraux, et en particulier de **polyplexes** : des nanoparticules issues de la complexation en solution d'ADN chargé négativement et d'un polymère chargé positivement. Cela sera abordé en détail en section 0. Ajoutons d'ores et déjà que le polyéthylèneimine (PEI) est un candidat idéal puisqu'il permet d'atteindre de manière routinière des taux de transfection de l'ordre de 60% pour un coût parmi les plus compétitifs, couplé à une quantité d'ADN d'intérêt d'environ 1 mg/L de culture (Hacker et al., 2013). La cytotoxicité lui étant associée en limite la concentration utilisable en culture, tout en autorisant des rendements en r-protéines de l'ordre de quelques dizaines de milligrammes à parfois près du gramme par litre de culture, cette grande variabilité étant liée au comportement idiosyncratique des r-protéines, ainsi qu'à la variété de PEI utilisée (Yves Durocher, communications personnelles).

2.2.2 Problématique de la délivrance *in vivo*

Aux barrières présentes à l'échelle cellulaire viennent maintenant s'ajouter des obstacles à l'échelle physiologique : plusieurs organes ont pour fonction naturelle de débarrasser le corps d'intrus comme des vecteurs de gène. En outre, les vecteurs eux-mêmes rencontrent une variété de tissus avant même de se retrouver à proximité des cellules qu'ils ont pour cible.

2.2.2.1 Thérapie génique contre le cancer

Dans ce contexte plus précis, les obstacles physiologiques se traduisent en contraintes de conception inhérentes aux vecteurs de délivrance de gène, et plus particulièrement pour le traitement de tumeurs (Tableau 2-1, et également Figure 2-13 section 2.7.3). Toutefois, bien que centrales, ces contraintes ne constituent qu'une partie du problème de conception dans son ensemble. En effet, si l'on prend du recul et que l'on envisage le chemin à parcourir entre le laboratoire et la clinique, une série de critères additionnels va s'imposer pour l'utilisation de vecteurs de gène, qui sont également ceux d'autres nanoobjets thérapeutiques.

Tableau 2-1 : Critères de conception pour les plateformes de nanoparticules pour la délivrance de gènes vers une tumeur. Les points techniques seront abordés dans le reste de ce chapitre. (adapté de (Dawidczyk et al., 2014))

Fonction	Besoins de conception	Stratégies possibles
Circulation	<ul style="list-style-type: none"> • Stable en circulation à 37°C 	<ul style="list-style-type: none"> • Éviter l'association avec les composants du sang • Potentiel zêta neutre voire légèrement négatif
Distribution	<ul style="list-style-type: none"> • Minimiser le volume périphérique dans les tissus • Minimiser l'association avec l'endothélium • Minimiser le transport paracellulaire 	
Élimination	<ul style="list-style-type: none"> • Minimiser l'opsonisation • Minimiser la reconnaissance par les cellules phagocytaires du MPS • Maximiser le temps de circulation • Minimiser la clairance rapide par les reins 	<ul style="list-style-type: none"> • Enrobage rendant la nanoparticule indétectable • Diamètre supérieur à 8 nm pour éviter la clairance rapide par les reins
Accumulation dans la tumeur	<ul style="list-style-type: none"> • Maximiser l'extravasation au travers de la vasculature de la tumeur 	<ul style="list-style-type: none"> • Diamètre inférieur à 200 nm pour le transport au travers des fuites de la vasculature imparfaite • Maintenir une haute concentration plasmatique • Améliorer l'effet EPR
Entrée dans les cellules tumorales	<ul style="list-style-type: none"> • Maximiser l'association/la pénétration pour les cellules tumorales 	<ul style="list-style-type: none"> • Ciblage actif vers les cellules tumorales
Délivrance du gène	<ul style="list-style-type: none"> • Libération des acides nucléiques • Routage intracellulaire jusque dans le noyau 	<ul style="list-style-type: none"> • Libération active ou passive des acides nucléiques dans le bon compartiment cellulaire • Maximiser la dose par cellule • Maximiser l'échappement endosomal

L'usage clinique de nanomatériaux comme les nanoparticules et les nanocapsules se démocratise, comme en atteste la commercialisation récente de ce type de produits : l'Abraxane, le DaunoXome, le Doxil, et le Marqibo¹⁰. Or, le transfert d'une formulation de nanoparticules du laboratoire à la clinique implique de nombreuses questions de galénique et de logistique dont la stabilité, le stockage, la distribution, le dosage, et les quantités à produire. En effet, il s'agit à la base d'une suspension colloïdale sujette entre autres à l'agrégation de ses constituants, à la dégradation de son principe actif voire à une perte de sa réactivité.

¹⁰ Sources : Celgene Corp (www.abraxane.com/), Galen Ltd (www.daunoxome.com/products/daunoxome), Janssen Products LP (www.doxil.com/), Spectrum Pharmaceuticals Inc (www.marqibo.com/).

Le principe est donc d'obtenir une formulation et un conditionnement de produit qui permettent aux cliniciens de l'utiliser simplement et sans contraintes de temps. C'est pour cela que plusieurs études ont déjà été réalisées avec pour objectif d'obtenir des nanoparticules ne perdant pas leurs performances sur une longue durée, même si ces nanoparticules ne sont pas encore des produits commercialisables (Abdelwahed, Degobert, Stainmesse, & Fessi, 2006). Dans ce cadre d'étude, la sous-section suivante présente la lyophilisation.

2.2.2.2 La lyophilisation

Il s'agit de la dessiccation sous vide poussé d'un produit préalablement surgelé. C'est un procédé couramment utilisé dans l'industrie pharmaceutique et également agroalimentaire (avec l'exemple du café instantané). Ce procédé – illustré Figure 2-1 – vise à placer le produit à l'état solide selon une structure adéquate pour sa conservation quand l'eau va être sublimée durant les séchages. On obtient finalement un lyophilisat qu'il va alors être plus aisé de traiter.

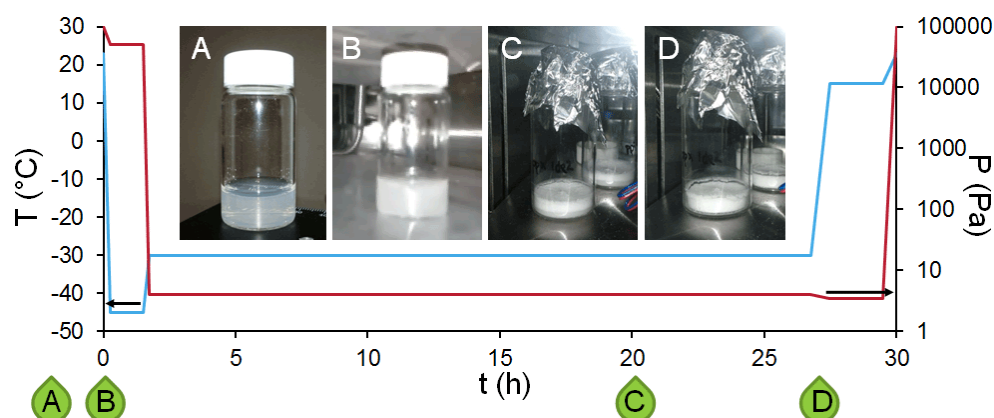


Figure 2-1 : Exemple de traitement de lyophilisation. Il se décompose en phases de congélation, traitement thermique, séchages primaire et secondaire sous vide (voir Chapitre 6). Les inserts illustrent l'allure d'un échantillon durant le processus.

La mise en pratique de la lyophilisation ne se limite pas au traitement en température et pression. Pour que celui-ci soit un succès, le produit à traiter doit au préalable contenir toute une série d'additifs, ou excipients, dont les principaux types sont résumés Tableau 2-2.

Tableau 2-2 : Exemples d'excipients communément utilisés pour la lyophilisation de produits pharmaceutiques. (adapté de (Abdelwahed et al., 2006))

Type	Fonction	Substance
Épaississants	Apporter de l'épaisseur à la formulation, particulièrement lorsque la concentration du produit à traiter est très basse	Hydroxyéthylamidon, tréhalose, mannitol, lactose, glycine
Tampons	Ajuster les changements de pH lors de la congélation	Phosphate, Tris•HCl, citrate, histidine
Modificateurs de température d'effondrement	Augmenter la température d'effondrement du produit afin de pouvoir le sécher à plus haute température	Dextrane, hydroxypropyl-β-cyclodextrine, polyéthylène glycol (PEG), polyvinyl pyrrolidone (PVP)
Stabilisateurs	Protéger le produit des stress liés à la congélation et à la dessiccation	Sucrose, lactose, glucose, tréhalose, glycérol, mannitol, sorbitol, glycine, alanine, lysine, PEG, dextrane, PVP
Ajusteurs de tonicité	Contrôler la pression osmotique pour donner une solution isotonique à l'emploi	Mannitol, sucrose, glycine, glycérol, chlorure de sodium

2.3 Vectorisation de gène

2.3.1 Définitions

Pour la suite, il convient de préciser le sens des mots *gène* et *vecteur*.

– *gène* – Ce terme volontairement généraliste est à comprendre ici comme une unité d'information génétique. Plus précisément, un gène désigne ici une séquence codante d'ADN – pouvant être transcrite en ARN messager, qui lui peut être traduit en une protéine – encadrée par un promoteur et un terminateur, voir Figure 2-2a.

– *vecteur* – Il y a deux emplois différents du terme vecteur ici. Premièrement, le gène à transporter est inclus dans un vecteur d'expression. Celui-ci est une molécule d'ADN circulaire (un plasmide, pADN) contenant les éléments nécessaires à sa production dans des bactéries, ainsi qu'à l'expression de la protéine encodée par le gène dans des cellules eucaryotes, voir Figure 2-2b.

Le second sens est celui de vecteur de délivrance de cette information génétique. Il s'agit donc de la particule qui va encapsuler l'ADN, le protéger, et permettre son transport jusqu'au noyau de la cellule où la machinerie de transcription va en exprimer le gène.

Utiliser des gènes permet d'amener une protéine à s'exprimer dans des cellules ciblées. En thérapie génique, ce sont des cellules d'un organisme malade (souvent les cellules malades elles-mêmes), et la protéine exprimée va avoir un rôle thérapeutique. En biotechnologie, ce sont des cellules cultivées en bioréacteur ; on veut alors produire puis récolter la protéine. Cela implique dans les deux cas le double besoin de vectorisation de gène. Il faut d'une part le transporter là où l'expression peut se faire – c'est-à-dire dans le noyau des cellules ; et aussi favoriser son expression en l'incluant dans un vecteur d'expression. La notion de vecteur de délivrance est abordée plus en détail dans la section 0, ce qui en fera ressortir les enjeux.

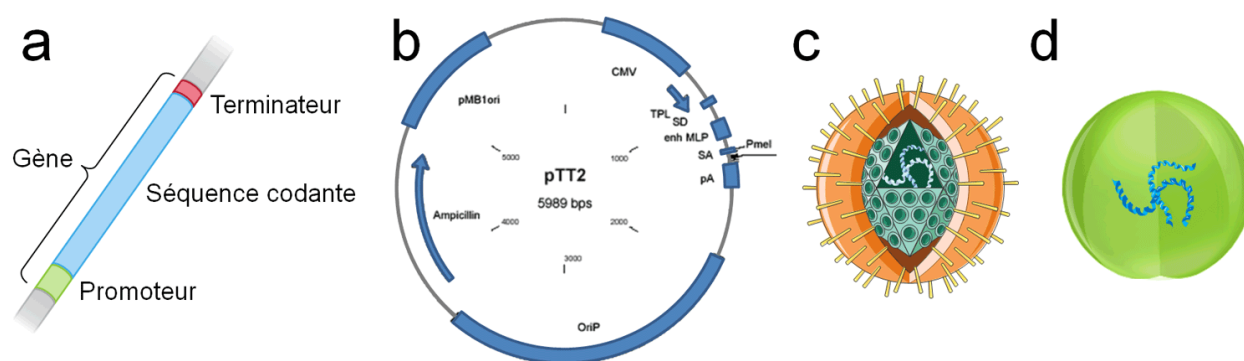


Figure 2-2 : Exemples de gène et de vecteurs. a : un gène le long d'une une séquence d'ADN ; b : un vecteur d'expression ((De Crescenzo, Pham, Durocher, & O'Connor-McCourt, 2003)) ; c : vecteur viral, virion à capside et enveloppe de type herpès ; d : vecteur non viral, nanoparticule encapsulant de l'ADN condensé dans son cœur.

Nous l'avons vu dans l'Introduction, vecteurs viraux et non viraux sont développés en parallèle car ce sont des technologies complémentaires. La section suivante aborde la classe de vecteurs non viraux avec laquelle nous avons travaillé.

2.4 Le polyplexe

2.4.1 Caractère polyanionique de l'ADN

L'ADN est un polyélectrolyte s'apparentant à un polymère anionique linéaire. En effet, la distribution des bases azotées suivant un code génétique bien précis n'influe pas sur le fait que le long de son axe sont distribuées des charges négatives à intervalles réguliers. Ces charges sont portées par les liens phosphodiester reliant les bases, voir **Schéma 2-2**.

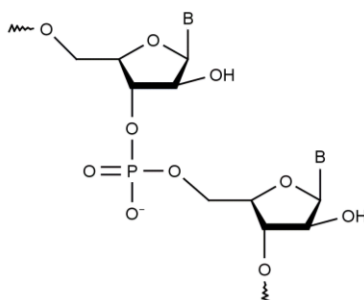


Schéma 2-2 : Lien phosphodiester entre deux bases azotées (B).

La taille d'un plasmide ADN tel que ceux utilisés pour la production de r-protéines est de l'ordre de 6000 paires de bases, ou 6 kbp. (Durocher, Perret, & Kamen, 2002) Cela correspond à un long polyélectrolyte linéaire de masse molaire moléculaire d'environ 4000 kDa. Sa longueur déroulée et relaxée avoisinerait 2 μm à raison de 0.34 nm par paire de bases (bp). Ces caractéristiques ne lui permettent pas de bénéficier des voies d'endocytose particulières au niveau cellulaire (Conner & Schmid, 2003) (voir Schéma 2-3), ainsi que de l'effet EPR au niveau systémique dans un contexte de lutte contre une tumeur solide *in vivo* (voir Figure 2-13 du chapitre suivant). En effet, ces deux phénomènes combinés impliquent de ne pas dépasser une taille d'environ 150 nm pour des nanoparticules (Maeda, Nakamura, & Fang, 2012). Cela va donc nécessiter de compacter l'ADN en le vectorisant sous forme de *nanoparticules*.

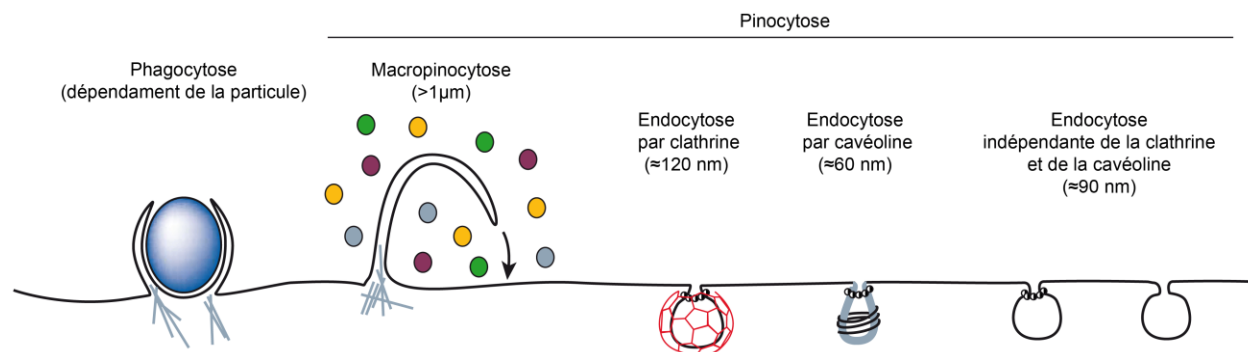


Schéma 2-3 : Multiples portails d'entrée des cellules mammaliennes. (adapté de (Conner & Schmid, 2003))

Quelle que soit la méthode, cette compaction va mettre en jeu des charges positives permettant de neutraliser la charge nette de l'ADN. Une grande variété de porteurs de charges positives a déjà été testée, ce qui a mené à une profusion de vecteurs de gènes, dont la diversité est illustrée Figure 2-3.

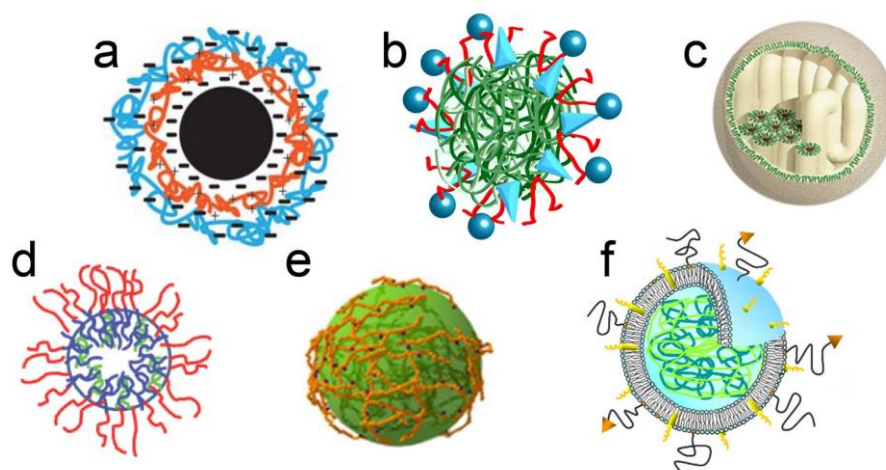


Figure 2-3 : Échantillon de la variété et des architectures de nanoparticules pour la délivrance de gènes et leurs similitudes. a : Complexe de polyélectrolytes multicouches (Shmueli, Anderson, & Green, 2010) ; b : « virus artificiel » (Ogris, 2010) ; c : lipoplexe (Gaber, 1998) ; d : micelle polymérique (Mishra, Peddada, Devore, & Roth, 2012) ; e : polyplexe encagé (Laga, Carlisle, Tangney, Ulbrich, & Seymour, 2012) ; f : cœur polymérique enveloppé d'une bicouche lipidique multifonctionnalisée (Hatakeyama, Akita, & Harashima, 2011).

La méthode qui nous intéresse ici pour condenser l'ADN est de le complexer avec un polycation, en particulier avec un polymère cationique, ce qui forme des polyplexes (mot valise provenant de l'anglais *polymer complex*). Cette complexation se fait spontanément en solution aqueuse par le mélange de solutions contenant l'une le polyanion, l'autre le polycation.

2.4.2 Les agents de polyplexation

Pour ces agents, la présence de multiples charges positives est un point nécessaire mais pas suffisant : elles vont permettre de condenser de l'ADN, mais cela n'est qu'une infime partie du processus de délivrance de gènes (voir Figure 2-13 et Figure 2-14 section 2.7.3). En réalité, les performances d'un agent donné vont dépendre de l'ensemble de sa structure. À ce jour, certains agents donnent d'excellents résultats *in vitro* lorsqu'utilisés seuls – c'est le cas du polyéthylèneimine (PEI) – rendant le processus relativement économique, simple et rapide à implémenter. Pour les applications *in vivo*, il devient nécessaire de se munir d'agents multifonctionnels ou d'un mélange d'agents permettant de découpler les éléments de structure du vecteur afin de le doter de l'ensemble des fonctions désirées. Ce point complexe est développé plus en détail section 2.7. Dans cette sous-section est abordée la diversité des agents de transfection polycationiques.

Le poly-L-lysine (PLL) – ce polypeptide est l'un des premiers agents de transfection à avoir été popularisé (Wu & Wu, 1987). La conception de chaînes de polypeptides offre une grande modularité tout en facilitant l'accès à des propriétés incluant : origine biologique, biodégradabilité et biocompatibilité. Schématiquement, tout acide aminé existant peut être incorporé dans un concept d'agent de transfection polypeptidique. Plus loin encore, l'usage d'acides aminés d'origine non naturelle devient lui aussi accessible (Kim, C. H., Axup, & Schultz, 2013). À titre d'exemple, à partir du PLL dont un des inconvénients principaux est la faible capacité d'échappement endosomal, de nombreux groupes ont exploré l'utilisation des autres acides aminés cationiques : l'arginine et l'histidine. Cela a permis de mettre en évidence des relations structure-fonction telles que la capacité du motif octa-arginine à déstabiliser la membrane cellulaire (Said Hassane, Saleh, Abes, Gait, & Lebleu, 2010), et de l'histidine à favoriser l'échappement endosomal (Leng & Mixson, 2005).

Les poly(β -amino esters) sont un autre bon exemple de l'éventail de possibilités offertes par la modularité des polymères cationiques. Ce sont des polymères pour lesquels une grande variété de monomères peut être combinée grâce à une plateforme de polymérisation adéquate, ce qui a permis de conduire des études de grandes chimiothèques, voir par exemple Figure 2-4.

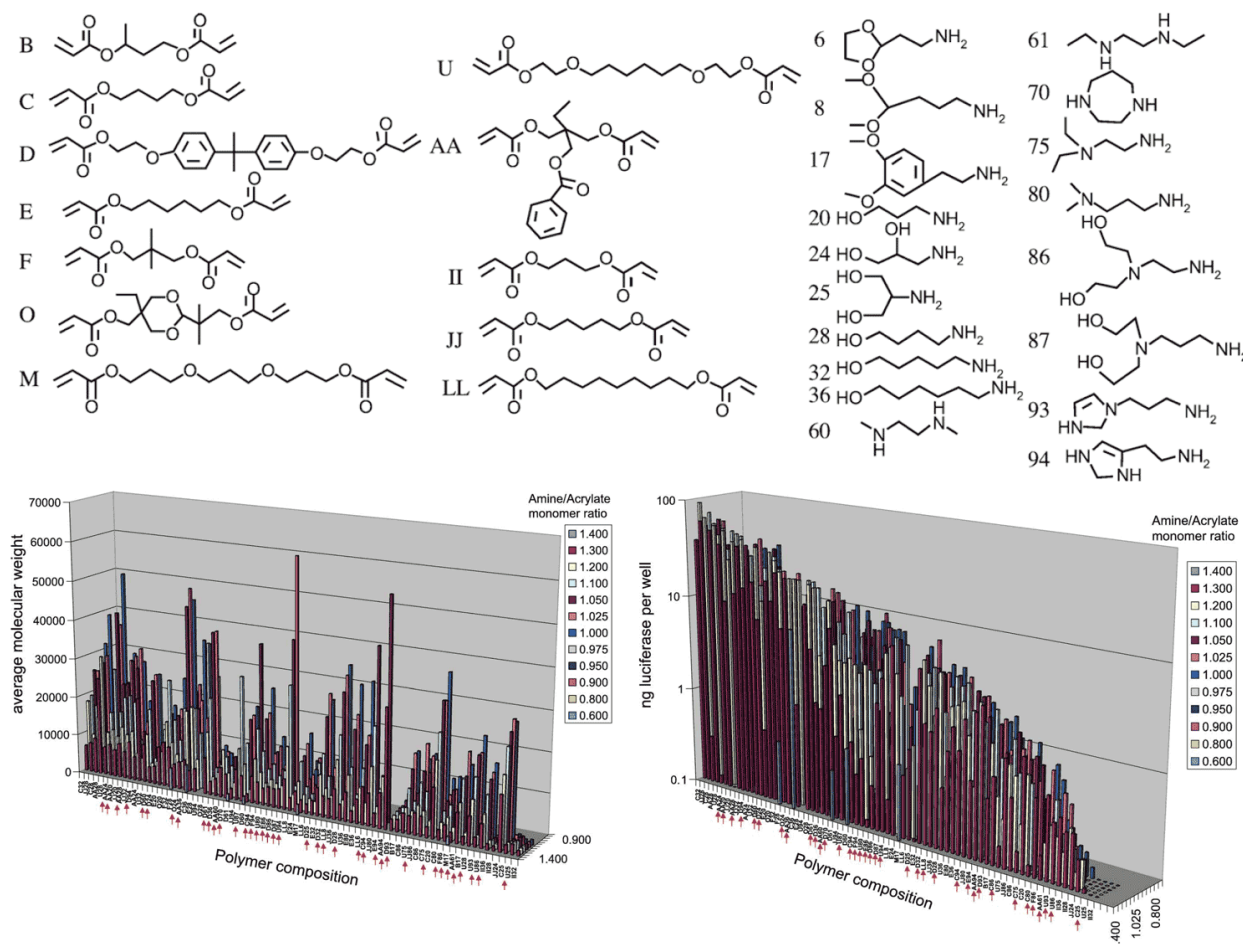


Figure 2-4 : Exemple de chimiothèque combinatoire. À partir de 30 monomères différents, 486 polymères de 70 structures primaires distinctes et de masses molaires moléculaires différentes ont été systématiquement évalués dans un contexte de transfection *in vitro*. (adapté de (Anderson, Akinc, Hossain, & Langer, 2005))

2.4.3 Le polyéthylènimine

Ce polymère – sous sa forme linéaire ou branchée (voir Schéma 2-4) – figure parmi les agents de transfection les plus répandus de par son excellent rapport coût performances, et ce

dans des conditions très variées *in vitro*. Derrière son apparente simplicité – un motif juste constitué de deux centres carbones et d’une amine – le PEI présente un comportement complexe quant à sa protonnation. Premièrement, les amines du PEI présentent un effet de plus proche voisin, qui tend à défavoriser l’ionisation (protonnation) d’une amine lorsqu’une ou plus de ses plus proches voisines sont déjà ionisées. Et deuxièmement, cet effet de plus proche voisin est fortement influencé par la présence d’ions en solution. (Richard, Thibault, De Crescenzo, Buschmann, & Lavertu, 2013)

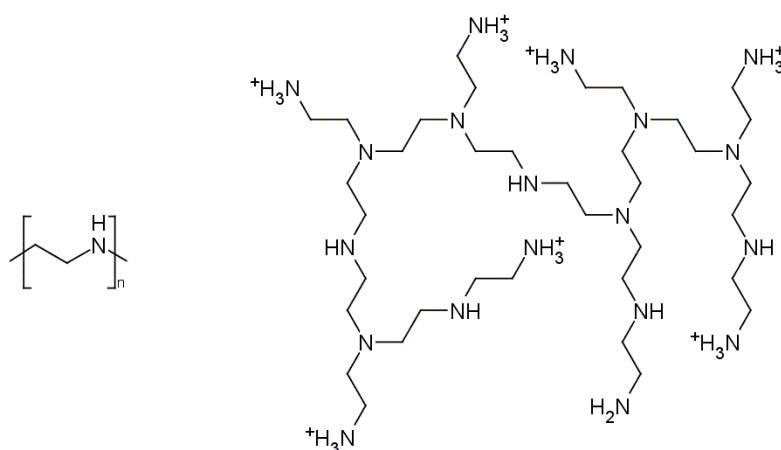


Schéma 2-4 : Illustration des structures linéaire et branchée du polyéthylèneimine.

Globalement, nous pouvons retenir que le bPEI n’est que partiellement protonné à pH physiologique, tant sous sa forme libre que lorsque complexé avec de l’ADN. Ainsi, dans le contexte d’une transfection, après endocytose des polyplexes par les cellules, une partie des amines restantes pourra alors se protonner lors de l’acidification des endosomes (voir Figure 2-5). Ce mécanisme est à la base de la théorie de l’éponge à protons, qui stipule que cette protonnation du PEI va faire affluer des contre ions chlorure dans l’endosome et favoriser sa rupture par élévation de la pression osmotique (Boussif et al., 1995). Par analogie avec le PLL vu dans la sous-section précédente, nous pouvons donc dire que certaines amines du PEI se comportent comme celles de résidus lysine, et que d’autres se comportent comme celles de résidus histidine.

Enfin, il faut retenir qu’une suspension de polyplexes non agrégés contient à la fois des polyplexes et du polycation en excès. En outre, dans le cas du bPEI, chaque polyplexe contient

entre une dizaine jusqu'à une centaine de plasmides par nanoparticule (Bhise, Shmueli, Gonzalez, & Green, 2012; Perevyazko et al., 2012), et donc entre quelques centaines et quelques milliers de molécules de bPEI.

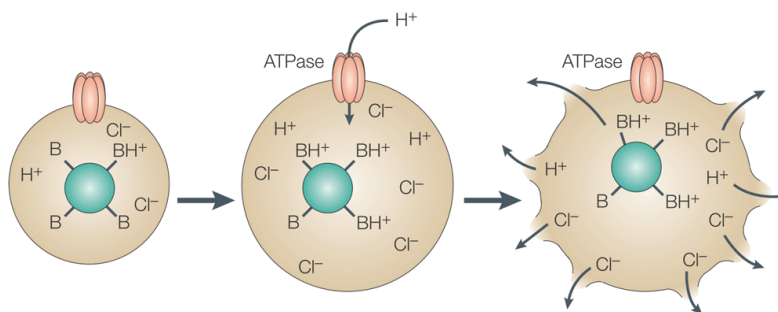


Figure 2-5: Effet d'éponge à protons. La protonation des sites basiques du polymère provoque un influx de protons et de contre ions dans l'endosome, le faisant gonfler par pression osmotique jusqu'à sa rupture. (Pack, Hoffman, Pun, & Stayton, 2005)

2.5 Caractérisation et suivi des nanoparticules

Dans cette section seront décrits et discutés les principaux instruments et techniques utilisés ainsi que ce sur quoi ils nous renseignent. L'accent sera mis sur les polyplexes.

2.5.1 Caractérisation biophysique

Comme dans ces travaux nous nous intéressons à des objets aux dimensions nanométriques, voire moléculaires, il n'est pas possible d'en avoir une expérience directe, par exemple au toucher ou à l'œil nu, ni même à l'aide de microscopie optique conventionnelle. En effet, ces dimensions – de l'ordre de la centaine de nanomètres et en deçà – placent ces objets en dessous des limites de diffraction de la lumière visible, dont les plus petites longueurs d'ondes (bleu) sont déjà de plusieurs centaines de nanomètres. Cela ne veut pas dire que les nanoparticules ne vont pas interférer avec la lumière visible, ni même que la microscopie optique est inutile. Cela va tout de même impliquer que les mesures à partir de lumière visible seront indirectes, comme pour la diffusion dynamique de lumière (section 2.5.1.2) et la microscopie à fluorescence (section 2.5.2.2).

2.5.1.1 Microscopie non optique

Lorsqu'avoir un aperçu direct des nano-objets est nécessaire, de nombreuses équipes ont recours à de l'instrumentation donnant accès à ces échelles. Cela implique la limitation que les nanoparticules doivent alors être déposées sur un substrat ultra plat et sec. Trois techniques peuvent alors être utilisées :

- La microscopie à force atomique (AFM), dont le mode de fonctionnement adapté à l'imagerie de nanoparticules est de balayer la surface où sont déposées les nanoparticules avec une pointe afin d'obtenir une mesure des différences de hauteur de la surface, voir l'exemple Figure 2-6a ;
- La microscopie électronique à transmission (TEM). En n'utilisant pas des photons mais des électrons, et ce à des énergies correspondant à de très petites longueurs d'ondes, il devient possible d'atteindre des résolutions adaptées aux nano-objets. En préparant un échantillon ultra plat et fin le rendant transparent à ces électrons, on peut obtenir une image en transmission, voir l'exemple Figure 2-6b.
- La microscopie électronique à balayage (SEM), où les électrons sont réfléchis par l'échantillon selon le relief de la surface de celui-ci. Cela nécessite alors d'avoir un échantillon réfléchissant ces électrons. En pratique, une nanocouche d'or de quelques nanomètres d'épaisseur est déposée sur celui-ci, voir l'exemple Figure 2-6c.

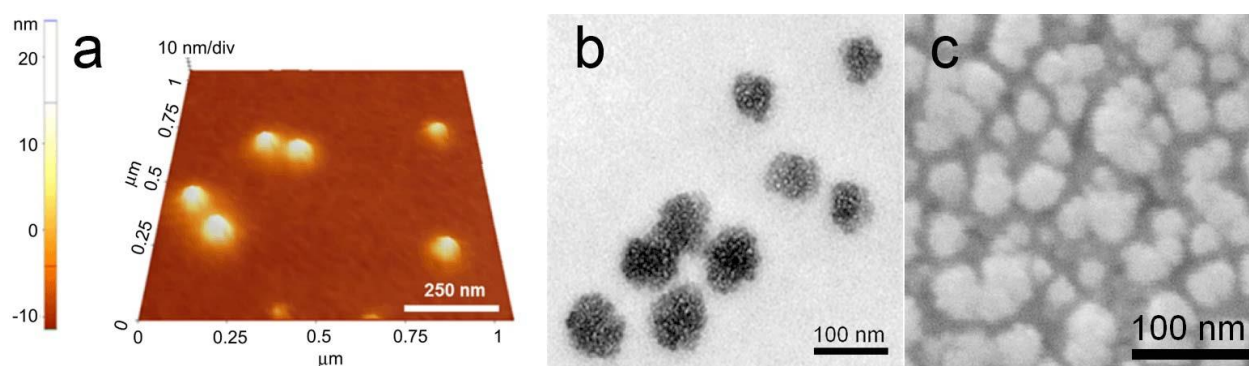


Figure 2-6 : Exemple d'images de nanoparticules à base de PEI prises en microscopie non optique. a : AFM (Kim, J. S., Oh, Park, Park, & Nam, 2013) ; b : TEM (Kim, J. S. et al., 2013) ; c : SEM (voir Chapitre 5).

La limitation physique commune à ces techniques est que les nanoparticules sont déposées sur un substrat exposé au vide. Ainsi, d'une part elles ne sont pas en solution, et d'autre part elles sont adsorbées sur la surface. Ces deux biais vont entraîner des déformations de la structure des nanoparticules. En particulier dans le cas de polyplexes, cela cause une diminution de leur taille du fait de la déshydratation (Niebel, Buschmann, Lavertu, & De Crescenzo, 2014). Des méthodes spécifiques en milieu hydraté incluant le cryoTEM et la SEM en phase liquide permettent de réduire ces biais mais sont encore très peu utilisées dans ce contexte.

En outre, ces instruments sont extrêmement coûteux, et il n'est pas raisonnable d'en faire un outil d'évaluation systématique pour le développement d'une formulation de nanoparticules. Toutefois, les précieuses informations auxquelles ces outils donnent accès en font un excellent complément dans la description et la documentation relatives à une formulation particulière de nanoparticules. Ainsi ils permettent d'évaluer distribution de taille des nanoparticules (taille moyenne et homogénéité de la distribution), et éventuellement leur géométrie.

2.5.1.2 Diffusion de lumière

Diffusion dynamique de lumière (DLS)

Si la limite de diffraction de la lumière visible empêche d'observer directement les nanoparticules, il reste possible de tirer des informations sur la façon dont ces dernières diffusent la lumière visible. La solution de Mie décrit un modèle de diffusion de lumière par des particules sphériques dont il est possible d'exploiter le principe par une instrumentation bien moins coûteuse et plus répandue que l'imagerie directe, la DLS¹¹. Celle-ci a en outre l'avantage de sonder une suspension de nanoparticules directement en solution, voir Schéma 2-5. En bref, lorsque l'échantillon est éclairé par le faisceau laser incident, les nanoparticules vont diffuser la lumière, et le détecteur va collecter des photons diffusés. Ce signal collecté va varier dans le temps car les nanoparticules se déplacent par mouvement brownien. Ce mouvement est aléatoire en direction, mais sa vitesse instantanée peut être reliée par le modèle hydrodynamique de Stokes-Einstein au

¹¹ Source : adapté du manuel d'utilisation du Zetasizer Nano Series, Malvern Instruments Ltd (www.malvern.com/Assets/Zetasizer-Nano-user-manual-English-MAN0485-1-1.pdf)

diamètre des nanoparticules. Ainsi, il devient possible de relier l'autocorrélation du signal collecté (qui traduit sa variation dans le temps) au diamètre des diffuseurs.

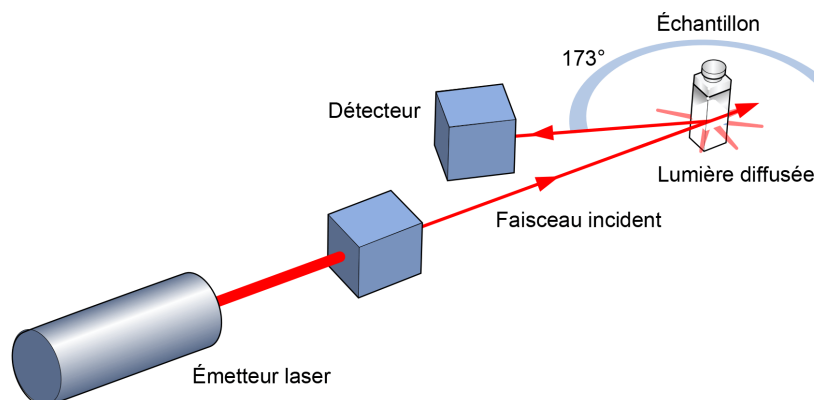


Schéma 2-5 : Diffusion dynamique de lumière appliquée à un échantillon en solution³.

L'usage de cette technique est très répandu dans la littérature. Il donne typiquement lieu à une validation de critère de dimension et d'homogénéité au moyen de deux grandeurs fournies par l'analyse DLS : un diamètre hydrodynamique moyen et un indice de polydispersité. Le diamètre hydrodynamique fourni par DLS représente le diamètre qu'aurait une sphère équivalente parfaite diffusant les photons de la même manière que les nanoparticules de l'échantillon. Comme nous l'avons vu, un critère indicatif relatif à l'utilisation de nanoparticules *in vivo* est que leur taille devrait se situer vers 150 nm ou moins (Conner & Schmid, 2003; Maeda et al., 2012). L'indice de polydispersité (PdI) traduit l'hétérogénéité de la distribution en taille. Cette grandeur n'a pas d'unité, et est comprise entre 0 et 1. Pour le cas théorique d'une distribution gaussienne en diamètre, le PdI correspond au carré du rapport entre l'écart-type et l'amplitude du pic. Dans la littérature, il est d'usage de considérer les suspensions comme très homogènes lorsque le PdI est en dessous de 0.1, et généralement convenables en deçà de 0.2–0.3 (Ma, P. et al., 2009; Tagalakakis, Saraiva, McCarthy, Gustafsson, & Hart, 2013).

Une troisième caractéristique des nanoparticules peut être mesurée grâce à la DLS ; il s'agit du potentiel zêta, voir Schéma 2-6. Cette grandeur permet d'évaluer la charge électrostatique moyenne en millivolts portée par les nanoparticules en suspension dans un fluide. En quelques mots, la technique utilisée ici est d'imposer un champ électrique dans la solution afin de rendre la vitesse des nanoparticules directement corrélée à leur potentiel zêta. Elle peut dans certains cas apporter un pouvoir prédictif du comportement des nanoparticules en présence

d'autres éléments chargés, particulièrement les cellules dont la membrane externe est globalement chargée négativement (Yousefi, Storm, Schiffelers, & Mastrobattista, 2013).

Le potentiel zêta décrit une interface, il va dépendre à la fois de la nanoparticule et de la solution qui l'entoure. Dans l'idéal, il faudrait donc le mesurer dans la solution la plus représentative de l'application visée. Cependant, cette méthode nécessite l'emploi d'un fluide diffusant peu la lumière, ce qui en limite l'emploi à des solutions de composition très simples (Buschmann et al., 2013). Cela peut remettre en cause le pouvoir de prédiction de cette mesure ; toutefois elle reste un élément de caractérisation accessible et instructif sur la nature des nanoparticules.

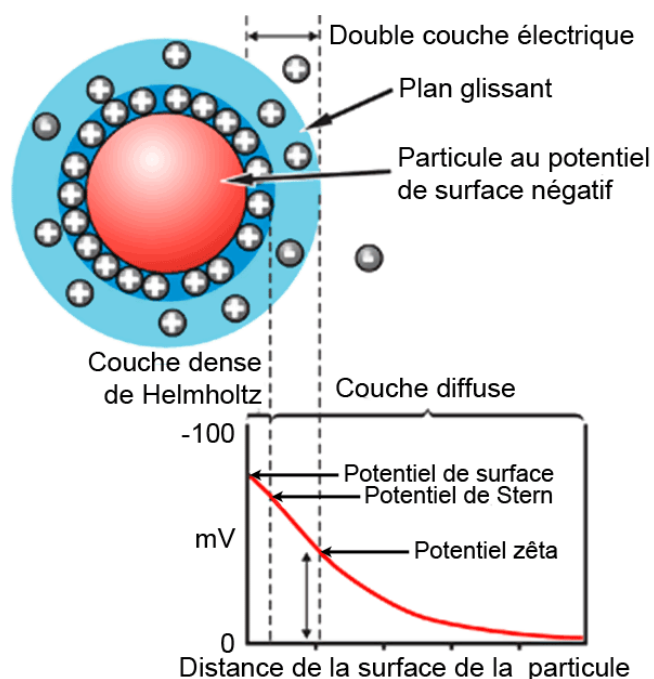


Schéma 2-6 : Structure d'une particule chargée, nature du potentiel zêta¹².

Diffusion statique de lumière (SLS)

Contrairement à la DLS, la SLS ne va pas limiter la collection des photons diffusés à un seul angle, en revanche la variation dans le temps du signal de diffusion ne sera pas mesurée.

¹² Source : adapté du manuel d'utilisation du Zetasizer Nano Series, Malvern Instruments Ltd (www.malvern.com/Assets/Zetasizer-Nano-user-manual-English-MAN0485-1-1.pdf)

Cela va permettre de récolter des données sur les lobes de diffusion radiale causé par les nanoparticules en suspension. Moyennant des mesures répétées sur une gamme de dilution de l'échantillon, la SLS va renseigner sur la masse moléculaire des nanoobjets, ainsi que sur le second coefficient du viriel, une propriété décrivant la force d'interaction entre les nanoobjets et le solvant⁴. La limitation qu'occasionne la SLS est qu'il faut diluer les échantillons, et les garder extrêmement propres. Cela rend les mesures plus difficiles qu'en DLS.

Analyse de traçage de nanoparticules (NTA)

Cette technique encore récente s'appuie elle aussi sur la capacité des nanoobjets à diffuser la lumière d'un laser visible. La différence est qu'ici, alors que l'échantillon est éclairé par le faisceau incident, une caméra va enregistrer la position de tous les objets diffusant dans son champ dans le temps, voir Schéma 2-7. Un algorithme de détection de trajectoire va permettre de traiter chaque objet séparément, ce qui va donner accès à des données mieux résolues sur la distribution en taille dans l'échantillon. Une limite à cette technique est qu'elle va nécessiter une forte dilution de la suspension de départ afin de permettre l'identification et le traçage de chaque nanoobjet (Nanosight, 2009).

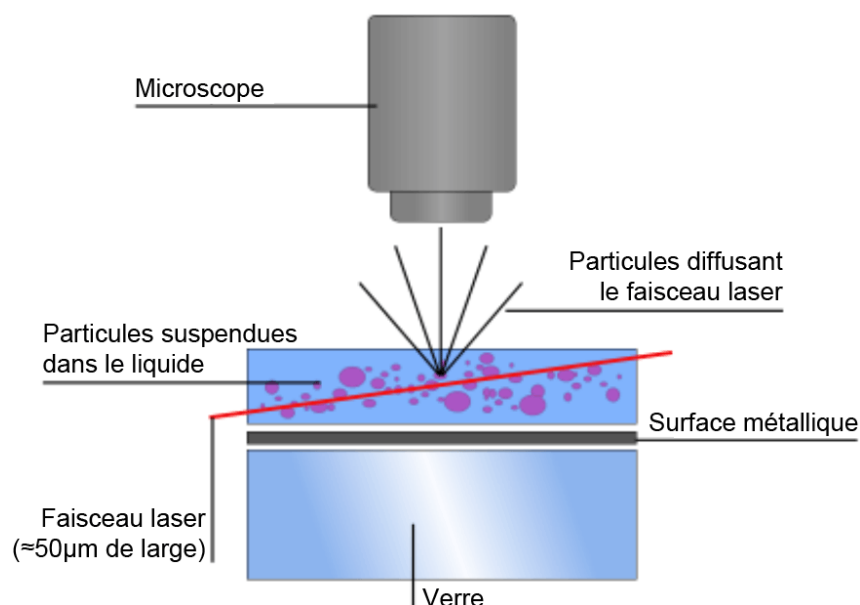


Schéma 2-7 : Principe de la NTA. (adapté de (Carnell, 2014))

2.5.1.3 Techniques de séparation

Les suspensions de polyplexes dont il est l'objet dans ces travaux sont des mélanges complexes comprenant à la fois des nanoparticules et des polymères libres. Il est ainsi intéressant de chercher à séparer les composants de ces échantillons complexes pour mieux les caractériser.

Test colorimétrique Orange II

Le dosage de polymère libre dans la suspension peut se faire par spectrophotométrie. Il suffit pour cela de séparer les nanoparticules du reste des solutés par centrifugation, puis de doser le surnageant pour le polymère d'intérêt. Dans notre cas, le PEI peut être dosé par le colorant Orange II, qui forme un complexe peu soluble avec les polyamines. Ainsi, les molécules d'Orange II complexées avec le PEI présent dans le surnageant vont elles aussi pouvoir être séparées par centrifugation, permettant de doser la concentration d'Orange II restante par spectrophotométrie d'absorbance. Ce test permet de mesurer la stœchiométrie d'une formulation de polyplexe avec une bonne sensibilité (Drogoz, David, Rochas, Domard, & Delair, 2007). Il ne donne en revanche aucune information sur la morphologie des polyplexes.

Électrophorèse sur gel d'agarose (AGE)

À l'inverse du précédent, la technique d'AGE permet de quantifier l'ADN libre à partir d'un échantillon. En bref, le principe est le suivant : les échantillons sont déposés dans un gel, qui est ensuite soumis à un champ électrique constant, voir Figure 2-7a. La porosité du gel permet alors le déplacement des molécules chargées par électrophorèse. Les polyplexes étant globalement neutres, ils ne vont que très peu migrer. De plus, un agent de contraste révélant uniquement l'ADN libre est utilisé, ce qui rend les polyplexes peu visibles, voir Figure 2-7b. Ces agents de contraste sont des molécules s'intercalant entre les bases de l'ADN, comme le bromure d'éthidium (EtBr). Leur fluorescence va être bien plus intense lorsqu'ils sont intercalés, d'où le contraste.

L'AGE permet plusieurs types de mesures. Premièrement, il y a la titration de l'ADN par le PEI, qui donne accès à la stœchiométrie de la suspension, comme cela est régulièrement présent dans la littérature, voir par exemple (Jain, Kumar, Agrawal, Thanki, & Banerjee, 2013; Kim, J. S. et al., 2013; Perevyazko et al., 2012).

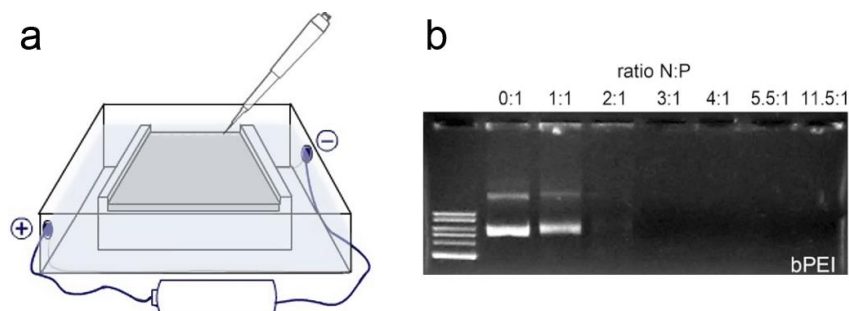


Figure 2-7 : Électrophorèse sur gel d’agarose (AGE). a : Schéma de montage ; b : exemple de titration par le PEI, où l’ADN libre fluorescent est visible en blanc (voir Chapitre 4).

Deuxièmement, la cohésion des nanoparticules contenant l’ADN peut être sondée. En effet, il est possible de visualiser si l’agent intercalant réussit à pénétrer dans le cœur de la nanoparticule en quantifiant la fluorescence du puits dans lequel sont restés les nanoparticules. L’implémentation de ce sondage se fait régulièrement sous forme de test de compétition : les nanoparticules sont incubées avec l’héparine, un polymère très fortement chargé négativement qui va faire compétition à l’ADN dans la nanoparticule. Lors de l’AGE, l’ADN va ainsi devenir de plus en plus visible et va également pouvoir migrer dans le gel, voir par exemple (Jain et al., 2013; Kim, J. S. et al., 2013).

Il est à noter ici qu’une autre technique permet de sonder plus quantitativement la force d’interaction à l’œuvre dans les polyplexes : la titration calorimétrique isotherme (ITC), voir par exemple (Ma, Lavertu, Winnik, & Buschmann, 2009).

Ultracentrifugation analytique (AUC)

Avec cette technique, les diverses espèces de la suspension à caractériser sont séparées par gravité dans une cellule en centrifugation. Les deux principales forces à l’œuvre sont la sédimentation et la diffusion. La séparation est donc ici bien plus fine que pour les méthodes précédentes. Suivant le régime de fonctionnement de l’ultracentrifugeuse, plusieurs informations sur l’échantillon peuvent être obtenues : la stœchiométrie du mélange, et la distribution de coefficient de sédimentation des nanoobjets, qui peut ensuite mener à la distribution en taille des nanoobjets dans le cadre d’un modèle (Niegel et al., 2014).

Mis à part son coût, une limite à l’emploi de cette instrument est que les expériences durent des heures voir des jours. Cela implique que l’échantillon doit être stable sur cette durée.

Fractionnement par couplage flux-force par filtration asymétrique (AF4)

Le principe général du fractionnement par couplage flux-force est de séparer les constituants d'un échantillon en le faisant circuler dans un canal soumis à un champ transversal par rapport à la direction du flux. Pour l'AF4, le champ transversal est causé par la présence d'une phase solide de porosité variable – donc asymétrique – dans laquelle les constituants vont se distinguer selon leur coefficient de diffusion, voir Schéma 2-8. Les détecteurs placés en sortie de l'appareil donnent accès à de nombreuses propriétés, qui sont alors résolues en coefficient de sédimentation. Parmi ces moyens de détection, on retrouve spectrométrie, DLS et SLS (Ma, Buschmann, & Winnik, 2010).

L'emploi de l'AF4 requiert lui aussi une dilution de la suspension dans une phase mobile. En outre, le banc expérimental nécessite une maintenance technique assez exigeante, le rendant inadapté à de fréquentes utilisations impromptues (Pei-Lian Ma, communication personnelle, novembre 2014).

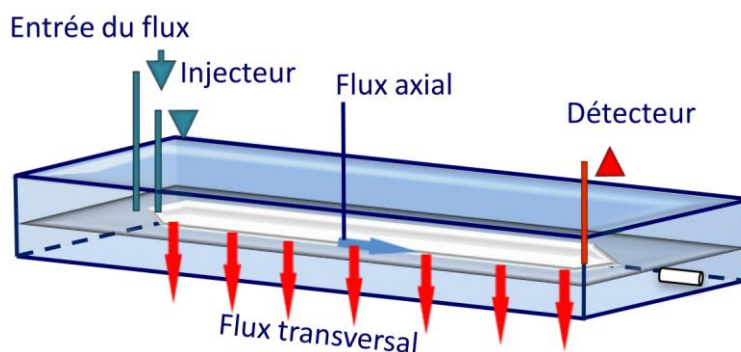


Schéma 2-8 : Concept de l'AF4. Le flux transversal est causé par la diffusion des espèces dans les pores de la phase solide. (Battu, Martin, & Pespes, 2009)

2.5.2 Suivi des nanoparticules *in vitro*

Si une connaissance détaillée des propriétés physiques des nanoparticules est nécessaire à des fins de caractérisation et de contrôle, il reste nécessaire de documenter les interactions entre nanoparticules et cellules. Ces interactions s'étudient par des procédés de culture *in vitro* classiques permettant une investigation par des instruments de microscopie et de cytométrie.

2.5.2.1 Marqueurs fluorescents

Comme nous l'avons vu, la taille des nanoparticules ne permet pas de les visualiser directement par lumière visible. Un moyen de contourner cette limite est de recourir à un marqueur fluorescent. Cela implique que les nanoparticules vont émettre un signal visible sous excitation lumineuse adéquate. Mieux : il est même possible de marquer chaque composant de la nanoparticule avec un fluorophore spécifique, comme présenté sur la Figure 2-8a (Bieber, Meissner, Kostin, Niemann, & Elsasser, 2002). Cela permet de suivre la colocalisation des composants de la nanoparticule, et éventuellement leur évolution spécifique.

Il est possible d'aller encore plus loin en choisissant un couple accepteur-donneur adapté, cela donne en plus accès au contraste FRET (transfert d'énergie par résonance de Förster) (Breuzard et al., 2008; Thibault, Nimesh, Lavertu, & Buschmann, 2010), comme présenté sur la Figure 2-8b. En plus de la simple colocalisation des fluorophores sur les images, le contraste FRET indique si les couples accepteurs-donneurs sont proches l'un de l'autre, par des distances de l'ordre de la dizaine de nanomètres ou moins (Thibault et al., 2010).

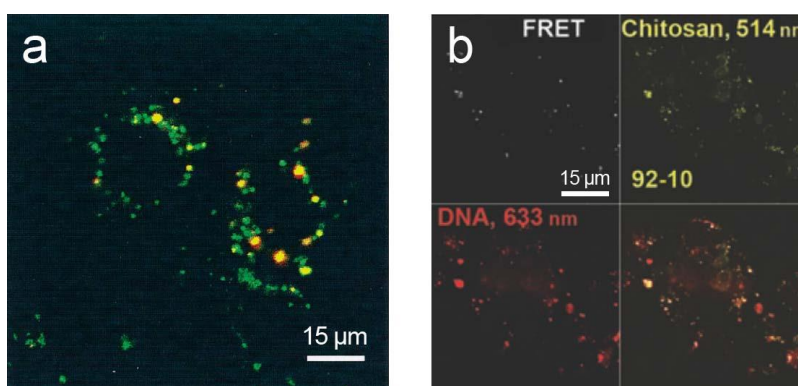


Figure 2-8 : Exemples de double marquage de polyplexes permettant de distinguer le polycation des acides nucléiques. a : Polycation en vert, et acides nucléiques en rouge (Bieber et al., 2002) ; b : Polycation en jaune, acides nucléiques en rouge, et signal FRET en blanc (Thibault et al., 2010).

Lors de l'utilisation de fluorophores, une des limites va être de minimiser leur impact sur le phénomène à observer. Dans le cas de polyplexes bPEI/ADN par exemple, il est possible de marquer le bPEI avec un marqueur fluorescent en le greffant par un lien covalent sur une amine

primaire. Le problème est que ces amines primaires jouent un rôle majeur dans la transfection. De même, un greffage covalent de fluorophore sur l'ADN pose évidemment un problème potentiel au niveau de la transcription de ce dernier lors de la transfection. Ici, une solution est de marquer l'ADN grâce à un agent intercalant, qui ne va pas avoir d'impact majeur sur la transcription, ni sur la capacité à former des polyplexes. Ainsi, il faut en général faire un compromis entre la visibilité du marquage et l'altération des performances à évaluer, et ce en termes de nombre de fluorophores par molécule à marquer et de mode de greffage. Une étude récente comparant greffages covalent et non covalent illustre très bien ce point (Rombouts et al., 2014).

Les cyanines dimériques forment une famille de marqueurs communément utilisés pour le marquage non covalent de l'ADN, elle comprend en particulier l'agent intercalant YOYO[®]-1. Ce dernier présente un avantage supplémentaire pour le suivi de polyplexes *in vitro* : il est possible d'éteindre sa fluorescence juste à l'extérieur des cellules par addition de bleu de Trypan (Chu, Q. et al., 1999), ce qui rend son utilisation avantageuse lorsqu'il faut distinguer les polyplexes à l'intérieur des cellules de ceux encore à leur surface (de Bruin et al., 2007).

Il est possible d'utiliser plusieurs fluorophores pour un même échantillon, à condition qu'ils soient à la fois compatibles entre eux, et que l'instrument dispose des lasers d'excitation et des détecteurs adéquats. Un exemple de sélection de trois fluorophores compatibles pour un instrument donné est reporté Figure 2-9.

L'efficacité de la délivrance de gènes pourra aussi être évaluée par fluorescence en termes d'expression de gènes rapporteurs. Là encore, toute une série de r-protéines fluorescentes sont utilisables suivant la combinaison de fluorophores désirée. On citera en particulier la protéine fluorescente verte (GFP) et l'une de ses dérivées bleue (BFP) (voir Figure 2-11b). Ces protéines ont seulement commencé à être utilisées en biotechnologie depuis le début des années 90 (Prasher, Eckenrode, Ward, Prendergast, & Cormier, 1992).

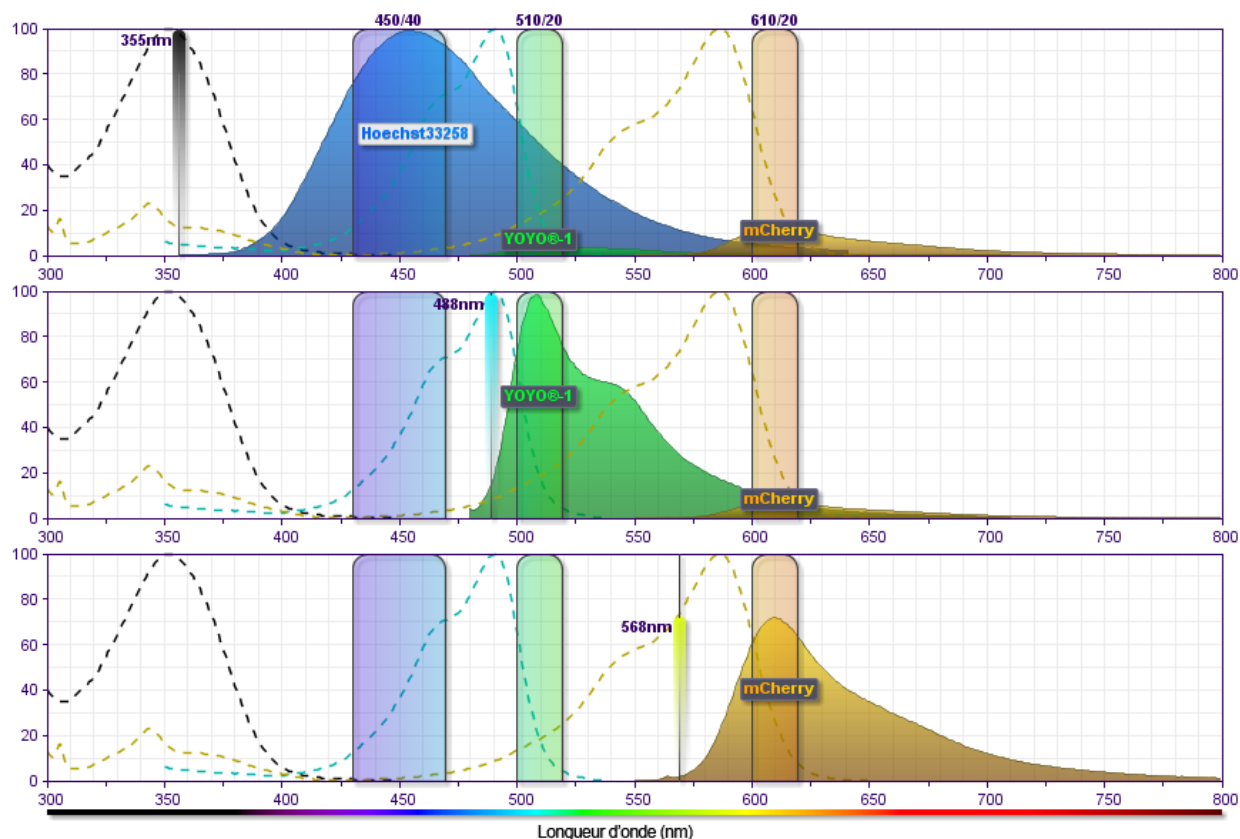


Figure 2-9 : Spectres et filtres correspondant à l'usage de trois fluorophores sur un cytomètre en flux BD LSR II. Les trois sous-figures correspondent aux spectres d'émission associées à trois longueurs d'ondes d'excitation : 355 nm, 488 nm et 568 nm. Les spectres d'excitation des fluorophores sont indiqués par des pointillés, et les filtres passe-bande de détection sont indiqués par des pavés verticaux¹³.

2.5.2.2 Microscopie optique à fluorescence

La microscopie optique permet d'imager les cellules en culture *in vitro*. C'est une méthode de routine, où le marquage fluorescent de nanoparticules va devenir un outil puissant. En effet, le signal fluorescent détectable émis par une seule nanoparticule sera visible, même si ce n'est que sous la forme d'une tache d'Airy – la plus petite dimension résoluble pour une imagerie

¹³ Figures générées avec: www.bdbiosciences.com/research/multicolor/spectrum_viewer/index.jsp

optique donnée. Une technique adaptée au suivi subcellulaire de nanoparticules est la microscopie confocale, pour laquelle cette limite de diffraction est de l'ordre de $0.5\ \mu\text{m}$ ¹⁴.

Avec la microscopie confocale, il est en outre possible d'imager un échantillon transparent en trois dimensions, au moyen de sections optiques (voir Figure 2-10a) ; toutefois la résolution en profondeur est plus faible que la résolution transversale⁵. La relative minceur de cette section optique permet tout de même de mener des études de colocalisation, dans l'hypothèse où la superposition de deux objets sur une image de microscopie confocale induit leur colocalisation physique dans l'échantillon imagé. Ça sera le cas pour des échantillons fixés, pour lesquels il est en plus possible d'affiner la colocalisation en incluant plusieurs sections optiques consécutives dans l'évaluation. Toutefois pour un échantillon vivant ce n'est plus possible ; en effet, les compartiments intracellulaires ainsi que les nanoparticules elles-mêmes vont se déplacer trop vite pour permettre l'acquisition d'images consécutives permettant de prouver la colocalisation. Si certains montages permettent une acquisition ultra-rapide – en particulier à l'aide de disques nipkow¹⁵ – une autre solution envisagée est de tracer la trajectoire des nanoparticules et des compartiments subcellulaires. Ce genre d'étude est plus fiable au niveau de la colocalisation, voir par exemple (Vercauteren et al., 2011). En outre, l'analyse de la trajectoire seule permet de distinguer le transport actif de la diffusion ou de l'immobilité (de Bruin et al., 2007).

En couplant cela à d'autres marqueurs fluorescents spécifiques à des compartiments intracellulaires, il devient envisageable de tracer les nanoparticules durant le processus de délivrance de gène. Les compartiments les plus étudiés dans ce cadre vont être ceux liés à l'endocytose, au cycle de maturation endolysosomal, et au routage nucléaire (Figure 2-10b–d).

¹⁴ Source : Olympus Corp (www.olympusconfocal.com/theory/resolutionintro.html)

¹⁵ Source : Carl Zeiss AG (zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/spinningdisk/introduction.html)

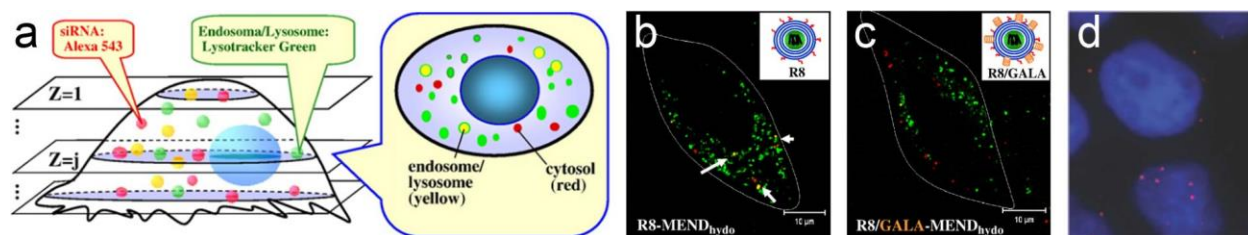


Figure 2-10 : Illustration de la microscopie confocale à fluorescence. a : Schéma du principe de section optique (Akita, Kogure, et al., 2011) ; b–c : présence ou absence de colocalisation entre des nanoparticules en rouge et les endolysosomes en vert (Akita, Masuda, et al., 2011) ; d : colocalisation de nanoparticules rouges avec les noyaux bleus (Chen, Kube, Cooper, & Davis, 2007). Images réalisées par microscopie confocale.

La microscopie est donc un outil essentiel pour la compréhension de phénomènes intracellulaires, en particulier pour le suivi de cellules vivantes. Toutefois, cette extraordinaire précision se fait au coût d'une faible puissance statistique, du fait que très peu de cellules seront observées dans le détail. Des techniques d'analyse d'image et de comptage automatique permettent cependant de fournir des données quantitatives, telles que les coefficients de corrélation de Pearson (Manders, E. M., Stap, Brakenhoff, van Driel, & Aten, 1992) et de chevauchement de Manders (Manders, E. M. M., Verbeek, & Aten, 1993).

2.5.2.3 Cytométrie en flux

La cytométrie en flux va permettre de quantifier l'intensité de fluorescence associée à chaque cellule prise séparément. Le principe est de faire circuler une suspension de cellules dans un canal de microfluidique jusqu'à les séparer les unes des autres au sein de la phase mobile. Ensuite, chaque cellule va être sondée par une série de lasers et de détecteurs adaptés à l'analyse d'un grand nombre de fluorophores. Typiquement, une dizaine de milliers de cellules validant un critère de viabilité seront analysées pour chaque échantillon.

Cette technique va apporter une puissance statistique bien supérieure à la microscopie, mais seulement à l'échelle de la cellule. La localisation intracellulaire n'est pas accessible par cytométrie en flux (Figure 2-11).

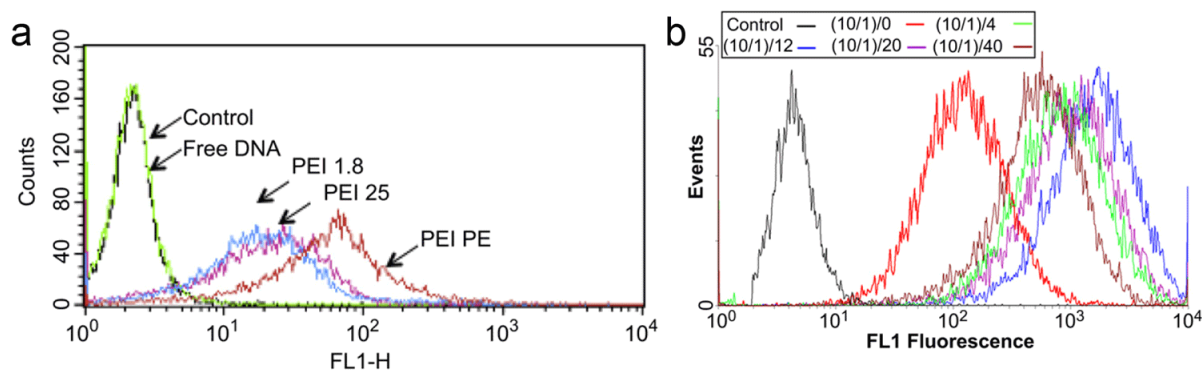


Figure 2-11 : Exemples de résultats de cytométrie en flux. a : l'internalisation de polyplexes par des cellules mammaliennes est quantifiée 4 heures post transfection en mesurant la fluorescence de polyplexes contenant de l'ADN marqué avec du YOYO[®]-1 (Sawant et al., 2012) ; b : l'expression transitoire de GFP est quantifiée 1 jour post transfection (Liao et al., 2012).

2.5.2.4 Microscopie électronique

Finalement, dans le cas où la localisation précise de nanoparticules dans les cellules est critique, sans toutefois nécessiter que les cellules soient vivantes lors de l'observation, la TEM est utile. Un exemple de résultat est reporté Figure 2-12.

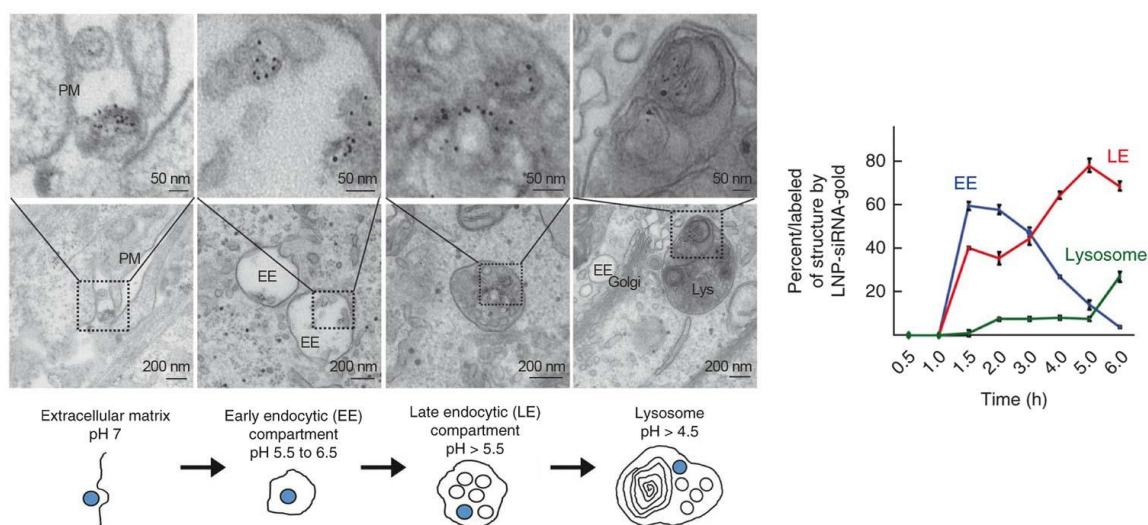


Figure 2-12 : Exemples de micrographes de cellules transfectées réalisés par TEM. (adapté de (Gilleron et al., 2013)).

2.5.3 Nanoparticules et environnement biologique

Les fluides biologiques – et en particulier le sang – sont des milieux complexes dans lesquels le comportement des nanoparticules va avoir une influence cruciale pour leur devenir. Cette complexité apporte une dualité avec laquelle il faut tout de même travailler : d'un côté il faut simplifier le problème afin de pouvoir séparer puis identifier les véritables facteurs principaux à l'œuvre. Ce type de limitation viendra soit de l'instrumentation (par exemple l'emploi de la DLS nécessitera l'absence de cellules, et de protéines), soit du fait que l'on souhaite quantifier le rôle de plusieurs facteurs séparément. Cela induit donc l'autre côté : si on sépare les constituants, leur synergie à l'œuvre dans le milieu biologique ne pourra pas être évaluée, ainsi que la plupart des réponses nécessitant le reste de l'organisme lui-même. Pour cette raison, la plupart des tests *in vitro* ont un faible pouvoir prédictif envers les performances *in vivo* (Yousefi et al., 2013).

Il n'est pas raisonnable de procéder à des tests *in vivo* à des stades d'exploration et de développement de formulation, car cela nécessiterait un usage abusif et non éthique d'animaux. De plus, cela ne ferait que déplacer le problème, puisque là encore, le pouvoir prédictif de nombreux modèles animaux reste décevant pour l'évaluation des performances chez l'humain (Shanks, Greek, & Greek, 2009). Ce phénomène est assez persistant pour les médicaments en général :

« Currently, nine out of ten experimental drugs fail in clinical studies because we cannot accurately predict how they will behave in people based on laboratory and animal studies. »¹⁶

Il y a toutefois une marge de manœuvre dans notre cas : si on ne peut pas vraiment parler de pouvoir prédictif, il existe tout de même un certain nombre de tests fournissant un critère d'applicabilité *in vivo* d'une formulation. Par exemple, si une formulation cause une agrégation massive d'érythrocytes lors d'un test *in vitro*, il paraît judicieux de doser celle-ci avec précaution lors d'éventuels tests d'injection systémique chez un animal, voire de la modifier en conséquence. En effet, cette hypothèse se vérifie pour des formulations à base de polycations

¹⁶ Source : Mike Leavitt, secrétaire à la Santé et aux services sociaux des États-Unis dans un communiqué de la FDA du 12 janvier 2006 (www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/2006/ucm108576.htm)

comme le PEI non modifié, donnant ainsi lieu à nombre de modifications de ce polymère afin de dépasser cette limitation (Höbel & Aigner, 2013; Patnaik & Gupta, 2013; Zhong et al., 2013).

Il y a ainsi plusieurs essais *in vitro* relatifs à l'environnement biologique qui semblent donner des informations pertinentes dans la sélection de formulations aptes à être amenées plus loin dans le développement de nanoparticules. Le Tableau 2-3 rassemble ces modalités d'évaluation pour le cas de polyplexes.

Tableau 2-3 : Différents niveau d'évaluation du comportement des polyplexes avec les composants du sang.

Fluide	Effet à évaluer	Méthode
Solution saline	Agrégation induite par la présence de sels	Suivi en taille dans le temps par DLS (Wang, Y. et al., 2011)
Sérum	Agrégation induite par la présence de protéines lors de l'opsonisation	Analyse SDS-PAGE des nanoparticules opsonisées (Trubetskoy et al., 2003)
Plasma	Réponse immunitaire par activation du système du complément, furtivité des nanoparticules	SDS-PAGE et immuno-buvardage de Western des nanoparticules incubées (Ogris, Brunner, Schuller, Kircheis, & Wagner, 1999)
Érythrocytes en suspension	Hémolyse et agrégation des érythrocytes	Essai d'agrégation d'érythrocytes (Kurosaki, Kitahara, Kawakami, et al., 2009; Ogris et al., 1999)
Sang	Réponse complexe d'un organisme hôte, combinaison des effets ci-dessus	Injection systémique <i>in vivo</i> avec un modèle animal (Taratula et al., 2009)

2.6 ARTICLE 1 : Modification de la surface de nano-particules non virales pour améliorer la délivrance de gènes

La section suivante de ce chapitre reprend l'article de revue intitulé *Surface modification of non-viral nanocarriers for enhanced gene delivery*, qui a été publié dans le journal *Nanomedicine* (Vol. 9, No. 1, p. 135-151) en janvier 2014.

Avec des nanoparticules non virales de délivrance de gènes sans cesse améliorées et diversifiées, les nanotechnologies biomédicales ont relancé la thérapie génique. Ces nanoparticules sont conçues pour traverser une série de barrières biologiques afin d'apporter leur cargaison jusqu'aux compartiments des cellules spécifiquement visées. Pour une application donnée, passer chaque barrière va demander une stratégie dédiée. Cette dernière se traduira au niveau de la surface des nanoparticules en une série de propriétés physico-chimiques, biologiques, et temporelles. Ainsi, pour le cas de la délivrance systémique de nanoparticules, plusieurs stratégies ont déjà été explorées afin de doter leur surface des traits adéquats. Dans ce contexte, cette revue va principalement traiter des nanoparticules organiques, pour lesquelles ces stratégies seront décrites puis discutées.

2.7 Surface modification of non-viral nanocarriers for enhanced gene delivery

Charles Fortier^{a,b}, Yves Durocher^a, Gregory De Crescenzo^{b,*}

^a Life Sciences | NRC Human Health Therapeutics Portfolio, Building Montréal-Royalmount, National Research Council Canada, Montréal (QC), Canada H4P 2R2.

^b Department of Chemical Engineering, Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales (GRSTB), Bio-P² Research Unit, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montréal (QC), Canada H3C 3A7.

* Correspondence should be addressed to gregory.decrescenzo@polymtl.ca

2.7.1 Abstract

Biomedical nanotechnology has given a new lease of life to gene therapy with the ever-developing and diversifying non-viral gene delivery nanocarriers. These are designed to pass a series of barriers in order to bring their nucleic acid cargo in the right subcellular location of the right cells. For a given application, each barrier has its dedicated strategy, which translates into a physico-chemical, biological, and temporal identity of the nanocarrier surface. Different strategies have thus been explored to implement adequate surface identities on nanocarriers over time for systemic delivery. In that context, this review will mainly focus on organic nanocarriers, for which these strategies will be described and discussed.

2.7.2 Keywords

Surface modification, biofunctionalization, non-viral gene delivery, polymeric coating, lateral stabilization, shielding, responsive tethering

2.7.3 Introduction

The paradigm of non-viral nucleic acid delivery has been established for several years (Glover, Lipps, & Jans, 2005). It is now widely acknowledged that viral and non-viral delivery systems are complementary to each other rather than competitors given the vast range of applications as well as yet to be met challenges (Mueller & Flotte, 2008). Non-viral nucleic acid delivery systems are mostly based on nanocarriers, a majority of which are made from organic materials – polymers, lipids, peptides, and their derivatives. These agents have originally been designed to encapsulate and protect the nucleic acid cargo. Comprehensive design criteria have been well identified (Pack et al., 2005), and are the subject of steady encouraging ameliorations of non-viral nanocarriers. Besides their ability to encapsulate nucleic acids, a number of these criteria come down to the interactions between the nanocarrier and its surrounding biological environment – that is the nano-bio interface (Nel et al., 2009). Figure 2-13 illustrates such interplay with the example of the systemic delivery of gene delivery nanocarriers for the treatment of a solid tumor. Within seconds after injection, interactions of the nanocarrier surface with blood components occur. In particular, opsonization is thought to trigger the formation of a protein corona enveloping the nanocarriers. The resulting surface properties of the nanocarrier

will greatly impact its fate in the biological milieu (Salvati et al., 2013). Furthermore, complex sequential hurdles along the intracellular trafficking of nanocarriers, as illustrated in Figure 2-14, highly depend on the presence of molecular cues on the surface of nanocarriers. That is why many efforts are being made to design and implement strategies to better control the surface properties of nanocarriers, without compromising their core properties, in order to enhance non-viral gene delivery.

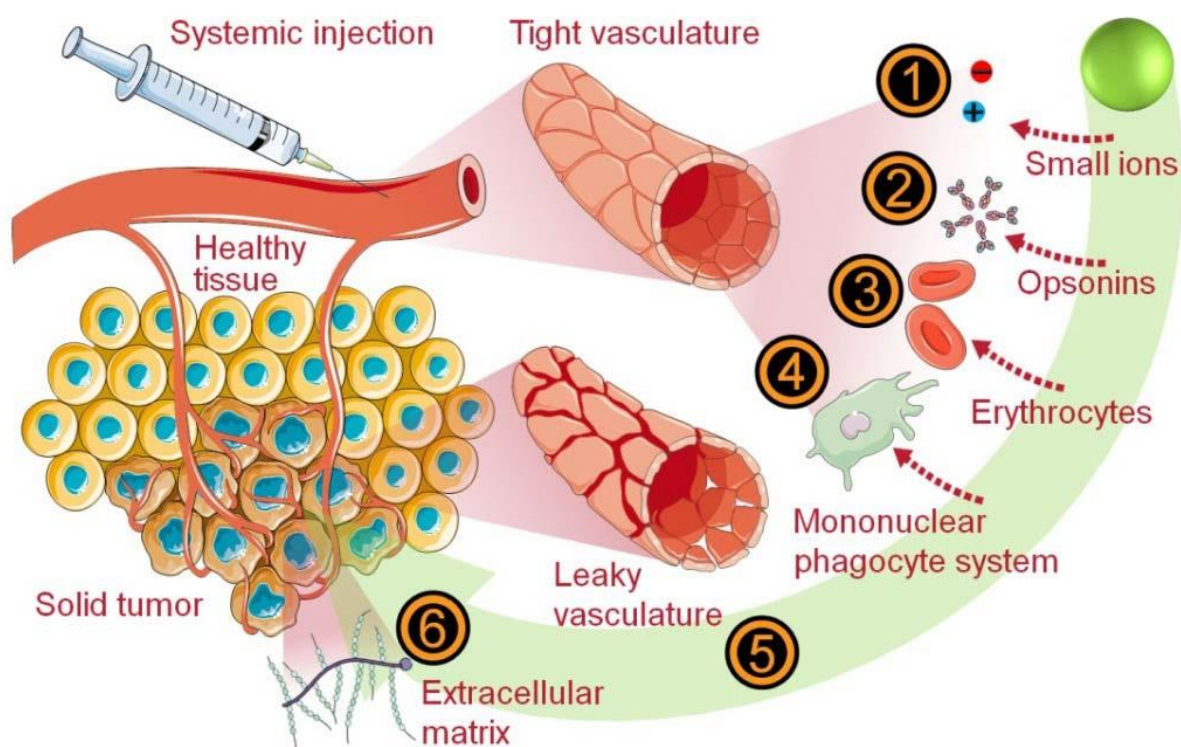


Figure 2-13: Extracellular hurdles encountered along the systemic delivery of nanocarriers for the treatment of solid tumors. ① Physiological salt concentration (small ions); ② Plasma proteins adsorption onto nanocarriers (opsonins); ③ Erythrocytes aggregation upon nanocarrier extracellular attachment; ④ Rapid clearance by the mononuclear macrophage system (MPS); ⑤ Fenestration of neo-vasculature at the tumor site; ⑥ Hindered diffusion through the extracellular matrix.

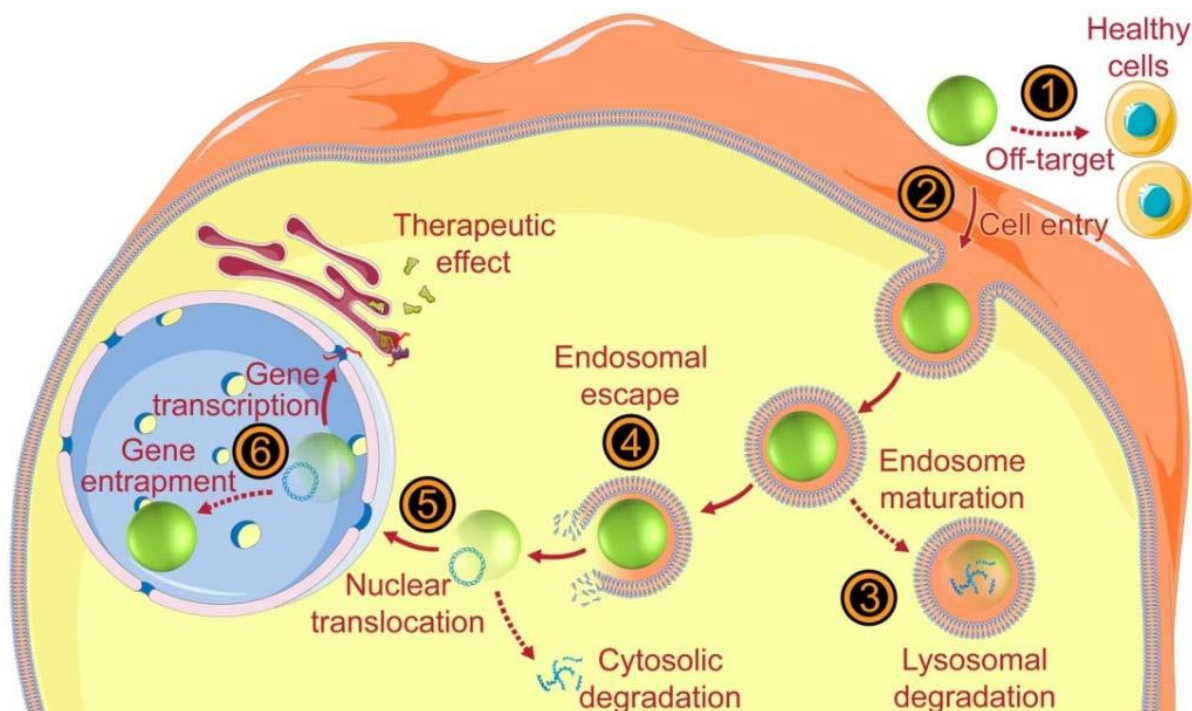


Figure 2-14: Intracellular hurdles along the delivery of plasmid DNA. ① Off-target transfection in healthy tissue; ② Endocytosis by target cell; ③ Endosome routing towards lysosomes and subsequent pDNA degradation; ④ Escape from endosome and release into the cytosol; ⑤ Active or passive transport towards the nucleus and across the nuclear pore system; ⑥ Release of pDNA from its nanocarrier for subsequent transcription.

2.7.4 The nanocarrier surface

2.7.4.1 Definition

It is crucial to grasp the notion of nanoscale surface in order to perceive the stakes of modifying the surface of nanocarriers so as to enhance gene delivery. From the chemical outlook, the availability of functional moieties at the surface will often be a prerequisite, yet physical aspects such as the overhanging of polymer chains or the molecular flip-flop of lipids may in fact govern the whole process. Thus, far from a mere geometrical feature, the nanocarrier surface can be pictured as a dynamic interface between a solid or semi-solid core containing the nucleic acid payload and an aqueous environment (see Figure 2-15). That interface has a certain thickness: it is anchored to the nanocarrier core, and it displays biological cues – such as surface charges or specific biomolecules – outwards.

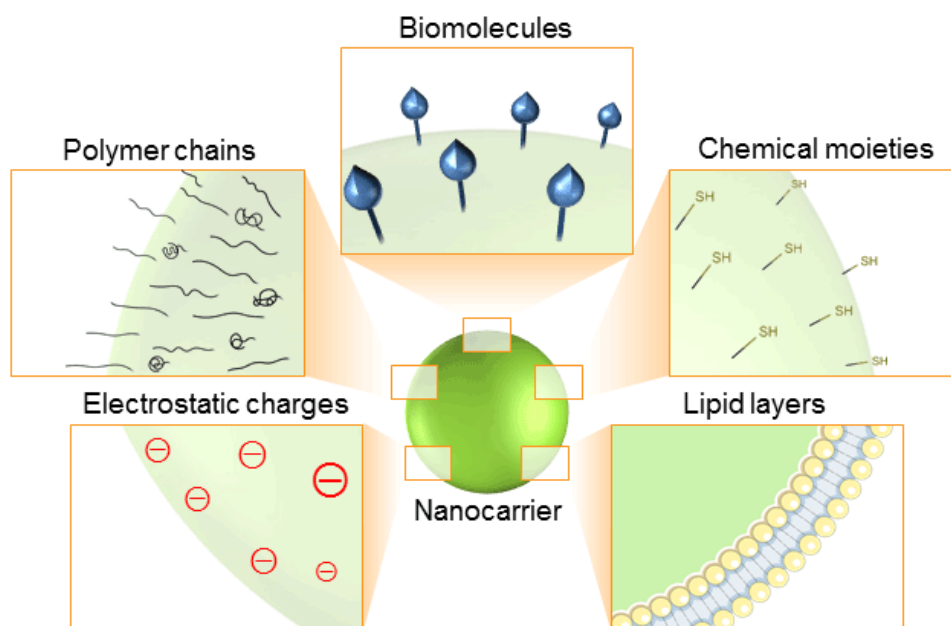


Figure 2-15: The different contributing structures of a nanocarrier surface. A transient combination of these contributing structures may help conceptualize the actual surface behavior of a given nanocarrier for a better understanding of its interaction with the biological milieu.

2.7.4.2 Modification steps: before or after surface formation?

In the field of biomaterials, surface modification is very common; yet in many cases macroscale surfaces have to be dealt with. When it comes down to nanocarriers, another aspect arises: the formation of the surface itself may be the critical step of the modification process.

In general, the surface of a nanocarrier forms as a result of the encapsulation of the nucleic acid cargo inside the assembly. A strategy to modify that surface can thus be implemented at three separate time frames: before surface formation, by chemically modifying the condensing agent; during the surface formation, by adding other agents in the formulation; or in a subsequent step involving additional agents. When nanocarriers have a limited stability and cannot be stored, surface modifications are preferably carried out before or during the formation of the surface. That is the case for many nanocarriers made of polymers, lipids and polypeptides, which are used within minutes to hours from their initial formation (Kasper, Troiber, Kuchler, Wagner, & Friess, 2013; Mandal et al., 2013). In this review, we will first discuss the range of modifications carried out before surface formation. We will then focus on actual surface modifications of nanocarriers that are designed to enhance gene delivery.

Carrying out modifications before the formation of the surface offers the possibility to include extensive purification steps. Purification would otherwise be hardly scalable on semi-solid nanocarriers in suspension without compromising their integrity (Mandal et al., 2013). Yet, it remains critically important to optimize and validate those pre-modifications, in terms of cohesion and shape of the nanocarrier core. Indeed, electrostatic and hydrophobic forces between the condensing agent and the nucleic acids uphold the nanocarrier core. Chemically modifying the condensing agent may thus decrease the density of these interactions, as discussed below.

Ideally, as for chemical grafting, reagent moieties would already be available on the surface of the nanocarrier to be modified. A good example is the pendant primary amino groups resulting from the encapsulation of nucleic acids by polycations such as branched polyethylenimine (PEI) or poly-L-lysine (PLL), which are called polyplexes. Yet, for some applications, chemical moieties such as protected thiols have to be conjugated to the nucleic acid condensing agent, with little impact on the core properties (Fortier, De Crescenzo, & Durocher, 2013; Roy, Jerry, & Thayumanavan, 2009). Such strategy was used by Roy *et al.* to increase the TAT peptide bioavailability on the surface of polyplexes, which would otherwise be limited due to a strong interaction between TAT peptides and DNA (Roy et al., 2009). Polycations such as PEI have been conjugated with small biomolecules, e.g., saccharides (Gajbhiye & Gong, 2013; Wijagkanalan, Kawakami, & Hashida, 2011) or peptides (Liu, C. et al., 2013; Liu, M. et al., 2011; Schäfer et al., 2011), but also with more sizeable biomolecules (Fella, Walker, Ogris, & Wagner, 2008; Shen et al., 2012) and polyethylene glycol (PEG) chains (pre-PEGylation) (Liu, C. et al., 2013; Schäfer et al., 2011; Zhang, X. et al., 2008), prior to nanocarrier formation. Such modifications strongly altered the nanocarrier size, shape and cohesion (Erbacher et al., 1999; Fitzsimmons & Uludag, 2012; Zhang, X. et al., 2008). In the case of polyplexes, incorporation of PEG prior to surface formation has been hypothesized to cause a decrease in the density of core electrostatic interactions that has been reported to confer diffuse, shapeless (Zhang, X. et al., 2008), even worm-like (Erbacher et al., 1999) unfit constructs (Mao et al., 2006). Similarly, lipid-containing nanocarriers featuring lipid layers at their surface are often PEGylated through the addition of lipid-PEG conjugates – such as PEG-DSPE (Kuai et al., 2011; Nakamura et al., 2012; Zhu, Kate, & Torchilin, 2012), PEG-DOPE or PEG-STR (Ishitsuka, Akita, & Harashima, 2011) – directly in lipid layer formulations. Several comparative studies reported similar limitations of pre-PEGylation compared with post-PEGylation for lipid-containing nanocarrier formulations

(Nakamura et al., 2012; Peeters, Sanders, Jones, Demeester, & De Smedt, 2007). Most recent works on polyplexes now include limited pre-PEGylation (Fella et al., 2008) in order to maximise the modification efficiency by decoupling the nanocarrier surface and core integrity.

Once a primary population of nanocarriers has been formed from the first building blocks, pre-modified or not, additional components may be added to the structure, either by auto-assembly, or chemically. This phase of surface modification can be followed by a purification step if the integrity of the nanocarrier can be preserved (Banerjee, Liu, Voss, Schmid, & Finn, 2010; Shim, Kim, Ahn, Chen, & Kwon, 2010; Zhu et al., 2012). Another strategy to circumvent purification steps is to minimize the amount of unwanted chemicals in the reaction mixture of modified nanocarrier and to use the latter as is (Fella et al., 2008).

2.7.5 Surface coating

Surface coatings include surface modifications designed to control the entire surface physicochemical identity of the nanocarrier. The aim of this type of modification is mostly to gain stability in the blood circulation (steps 1 to 4 Figure 2-13), but also to mediate cellular entry and escape from endosomes (steps 1 and 3 Figure 2-14, respectively).

2.7.5.1.1 Monovalent tethering

A monovalent surface coating corresponds to the functionalization of a substrate through a single bond between the surface and each biomolecule in order to yield an efficient physical envelope separating the core of the nanocarrier from the exterior. The most prominent example of this technique is PEGylation, although monovalent coatings with other hydrophilic agents such as polysaccharides, poly amino acids or poloxamers have also been investigated (Amoozgar & Yeo, 2012; Fakhari, Baoum, Siahaan, Le, & Berkland, 2011; Romberg et al., 2007). For a more detailed review on monovalent PEGylation and the subsequent characterization and evaluation of coated nanoparticles, see (Jokerst, Lobovkina, Zare, & Gambhir, 2011). The density of such grafted hydrophilic chains can be tuned so as to yield so-called mushroom or brush conformations. The latter has been reported to promote a better shielding of nanocarriers, yet it proved harder to achieve for longer PEG chains (Jokerst et al., 2011). Several geometrical features related to both the nanocarrier and the shielding chain influence the threshold surface

density for the brush conformation, making it a subtle feature to harness. The extensive data collected on PEGylation over the last decades have shed light on limitations to the use of PEG for stealth coating, *e.g.*, accelerated blood clearance (ABC) after repeated systemic administrations, which may be related to anti-PEG antibodies, and the non-biodegradability of PEG (Romberg et al., 2007). For more details about PEG alternatives for the stealth coating of nanocarriers, see (Amoozgar & Yeo, 2012).

Another issue specific to monovalent surface coating is the phenomenon coined as core parts “drawing”, whereby hydrophilic PEG chains are thought to gradually escape the nanocarrier surface, taking away the molecule it is grafted on (Laga et al., 2012). Destabilization of the nanocarrier core integrity has also been hypothesized to be related to an internal rearrangement of post-PEGylated nanocarriers over time (Oupicky et al., 2002).

2.7.5.2 Multivalent tethering

2.7.5.2.1 Multivalent polymeric coating

A multivalent surface coating refers to the use of coating agents bearing multiple anchor sites able to dock onto the pre-formed nanocarrier. This approach addresses the issue of core parts “drawing” raised against monovalent PEGylation (Laga et al., 2012). Furthermore, such coatings have been reported to form more consistent nanocarrier outer envelopes, thus enabling a better decoupling of its core and surface properties. Anionic polymers form the most widely used class of multivalent coating agents (see Table 2-4). This stems from the fact that a large fraction of non-viral nanocarriers feature a positively charged surface, which has repeatedly been associated with poor *in vivo* biodistribution, specificity and toxicity profiles (Harris et al., 2010; Jokerst et al., 2011; Pack et al., 2005). Through multiple electrostatic interactions, anionic polymers are thought to auto-assemble onto positively charged nanocarriers, yielding shielded hydrophilic nanocarriers with increased salt stability and enhanced serum resistance. There is however a persisting drawback to this technique. Primary nanocarrier populations formed by the mixing of nucleic acids and cationic materials often yielded free remaining cationic material in solution. Thus, upon addition of polyanion, a subpopulation of nanoparticles without nucleic acid cargo is generated; it was coined as “ghost particles” by Hönig *et al.* for their PEI-based

polyplexes (Honig et al., 2010). Although their presence yields poorly defined nanocarrier suspensions, it is not necessarily a liability for the overall transfection process. The authors hypothesized that “ghost particles” and nanocarriers cointernalization in target cells helped reduce the toxicity associated with free PEI while yielding a productive proton sponge effect. The formulation ratio is therefore a key parameter to optimize in the design of electrostatic polymer coatings.

Table 2-4: Polymers used *in vivo* for the electrostatic coating of nucleic acid delivery vectors. \ominus represents the polyanions charge bearers.

Polyanion	Mol. Wt. <i>kDa</i>	Charge density \ominus/kDa	Charge bearer	Polycation or cationic lipid	Optimal ratio $\ominus:N:P$	Results highlight	Reference
o-Carboxymethyl chitosan	50	2.8	$-\text{COO}^-$	protamine		↓ Cytotoxicity pH-triggered uncoating Similar expression in tumor	(Li et al., 2012)
Hyaluronic acid	1000	2.6	$-\text{COO}^-$	BPEI 25 kDa	12:12:1	Freeze-dry-proof Partial tumor suppression	(Ito, Yoshihara, Hamada, & Koyama, 2010)
Poly(α ,D-glutamic acid)	3.2	5	$-\text{COO}^-$	Poly(beta-amino ester) C32-117	33:33:1	↓ Uptake in lung ↓ Erythrocyte aggregation	(Harris et al., 2010)
Chondroitin sulfate C		4.3	$-\text{COO}^-$ and $-\text{SO}_3^-$	DOTAP	5.8:4:1	↑ CD44 targeting ↓ Uptake by cells ↓ Erythrocyte aggregation ↓ Liver toxicity	(Hattori, Yamasaku, & Maitani, 2013)
Hyaluronic acid	31	2.6	$-\text{COO}^-$	DOTAP	5.6:4:1	↑ CD44 targeting ↓ Off-target Rapid uncoating	
Poly(α ,L-glutamic acid)	10.5	7.7	$-\text{COO}^-$	DOTAP	7:4:1	↓ Erythrocyte aggregation ↓ Liver toxicity	
PEG-succinic acid	9.7	3.7	$-\text{COO}^-$	LPEI 25 kDa	5:8:1	↑ Proton sponge effect	(Sakae et al., 2008)
RGD-PEG-succinic acid	12	2.9	$-\text{COO}^-$	LPEI 25 kDa	4:12:1	↑ Gene expression in liver, lung and tumor	
Dendrimer phtalocyanine	5.9	6.6	$-\text{COO}^-$	C(YGRKKR RQRRRG) ₂	1:2:1	Photochemical internalization ↑ Colloidal stability ↓ Off-target ↓ Toxicity	(Nishiyama et al., 2005)

Some selected polymers for the multivalent electrostatic coating of non-viral gene delivery vectors are listed in Table 2-4. The reader is here referred to two reviews discussing electrostatic (Shmueli et al., 2010) and polymeric (Laga et al., 2012) surface modifications for nucleic acids delivery. Note that the polymer coating itself can be used as a targeting agent. For example, chondroitin sulfate C and hyaluronic acid have been used to target the CD44 receptor, a cancer biomarker. Polymer coatings have also been designed to promote endosomal escape. For example, polypropyl acrylic acid (PPAA) is an anionic polymer at physiological pH that converts into a neutral, more lipophilic one upon endosomal acidification, thereby displaying membrane disruptive abilities (Lee, L. K., Williams, Devore, & Roth, 2006). Surface modifications of gene nanocarriers can even play a role at the ultimate step of the delivery, *i.e.*, gene transcription (see step 6 Figure 2-14). Amphoteric polymer coatings have been designed to activate gene transcription, thus mimicking the role of natural high mobility group (HMG) proteins. For instance, Yoshihara *et al.* reported the development of an amphoteric PEG derivative, bearing a combination of primary amino groups and carboxylic acids. The authors finely optimized the moieties content of their PEG derivative so as to maximise mRNA titers related to their PEI/pDNA polyplex-mediated *in vitro* transfection assays (Yoshihara, Shew, Ito, & Koyama, 2010).

2.7.5.2.2 Other surface cross-linking agents

Further decoupling the multiple properties of a nanocarrier can be achieved by addressing lateral and steric stabilization separately. Steric stabilization refers to PEGylation and related hydrophilic polymer coatings, whereas lateral stabilization refers to the surface reticulation by chemical or electrostatic bonds designed to strengthen the assembly against disruptive agents such as heparin.

Also called nanoparticle caging, surface cross-linking is often based on stimuli-responsive bonds such as disulfide bridges (Russ et al., 2010; Taratula et al., 2009) or acid-labile ketal linkers (Shim et al., 2010). Taratula *et al.* developed such a strategy and performed thorough studies on their polypropylenimine (PPI) dendrimer-based siRNA delivery system (see Figure 2-16) (Taratula et al., 2009). Free primary amines from their nanocarrier surface were cross-linked with a homo-bifunctional disulfide-bridged reagent. Remaining free primary amines were used for post-PEGylation (see step 3 Figure 2-16A). Caging efficiently prevented siRNA release *in vitro* upon addition of poly(methacrylic acid), a competing polyanion, where PEGylation only

had a poor outcome (see Figure 2-16B). The silencing ability of the nanocarrier upon caging was fully preserved *in vitro* (see Figure 2-16C), and subsequent *in vivo* biodistribution performed 3 days after systemic injection in nude mice bearing a human lung cancer xenograft proved outstanding (see Figure 2-16D), which strongly suggested that the temporality of the reducible caging was adequate. Russ *et al.* used dithiobis(succinimidyl propionate) (DSP) in a similar cross-linking strategy: their reducible cross-linking yielded an increased and prolonged pDNA-mediated gene expression after intratumoral injection in mice compared with a non-reductive cross-linking and with no cross-linking. Systemic delivery resulted in an increased tumor-specific gene expression and a decreased off-target to other organs (Russ *et al.*, 2010).

2.7.5.3 Polymer/lipid hybrid system

Through numerous attempts to combine the advantages of both polymer- and lipid-based nanocarriers, a new class of hybrid nanocarriers has emerged. The multiplicity of these hybrid architectures is illustrated by the varied nomenclature found in literature: multifunctional envelope-type nano device or MEND (Ishitsuka *et al.*, 2011; Kusumoto *et al.*, 2013), nanoplex (Jain *et al.*, 2013), lipid polymer nanoparticle or LPN (Xue & Wong, 2011), or the more general CSLPHN for core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles (Mandal *et al.*, 2013). Polymer/lipid hybrid systems materialize an advanced way to decouple core and surface properties of the nanocarrier, most often in order to combine the optimized mechanical properties of a polymeric core with a more biomimetic surface made of lipid. Polymer/lipid hybrid systems have been thoroughly reviewed recently (Mandal *et al.*, 2013). One step further in biomimicry is the use of actual erythrocyte membranes to coat nanocarriers, as first described by Hu *et al.* (Hu *et al.*, 2011).

One of the main methods used to form these systems is to prepare polymeric nanocarriers in a first step, which are then co-incubated with either pre-formed liposomes or with their precursor monolayer while the latter is being rehydrated. Numerous variations on a single step method have also been reported. Temperature, solvent type or pH, mechanical energy input, compounds and formulation ratios are the main control levers that can be used to adjust the size, surface charge, shape and polydispersity of the nanocarrier distribution (Mandal *et al.*, 2013).

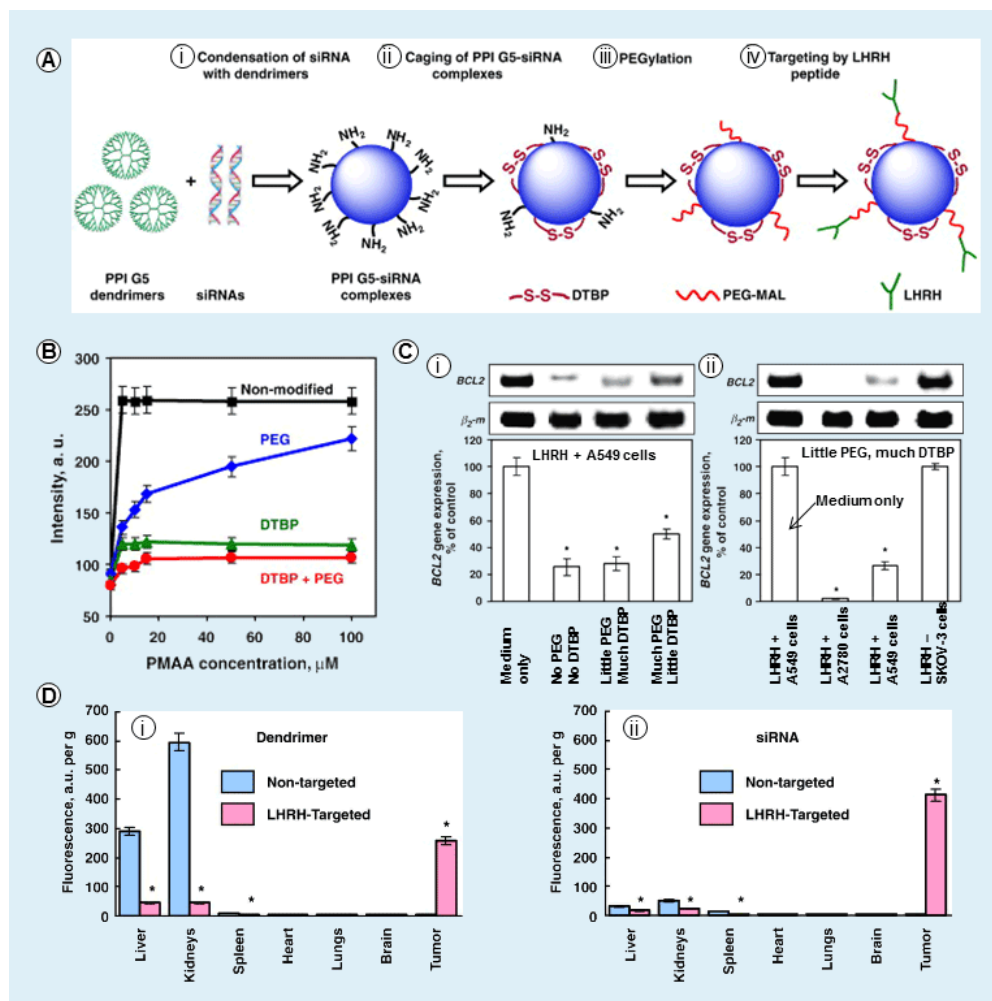


Figure 2-16: Tumor-targeted siRNA delivery by a multi-functional nanocarrier. (A) Nanocarrier formation and sequential surface modification strategy. (B) siRNA release kinetics upon nanocarrier disruption by PMAA: Combined effects of PEGylation and caging. (C) *In vitro* silencing of BCL2: Impact (Ci) of PEGylation density and (Cii) of LHRH targeting (D) Biodistribution in mice (Di) of the siRNA condensing agent and (Dii) of siRNA in major organs 72 hours after injection.

* $p < 0.05$.

PPI: polypropylenimine; DTBP: Dimethyl-3-3'-dithiobispropionimidate; PEG-MAL: maleimidated PEG; LHRH: synthetic analog of luteinizing hormone-releasing hormone decapeptide; BCL2: mRNA target (B-cell lymphoma 2, a regulator protein involved in apoptosis); β_2 -m: mRNA internal standard.

Reproduced with permission from (Taratula et al., 2009).

2.7.6 Surface decoration

Complementary to surface coating, the decoration of nanocarriers with various types of biomolecules has been envisioned and tested for a range of applications in order to better control the fate of the nanocarrier *in vivo*. Decoration differs from coating as it is not designed to change physical properties such as surface charge or hydrophilicity, but rather to add a specific biological function. Active targeting of nanocarriers by means of a ligand specific to a relevant biomarker is the main implementation of surface decoration.

2.7.6.1 Active targeting

This concept enables the selective delivery of nanocarriers to a target-bearing subpopulation of cells. To date, a broad variety of molecules has been used as targeting agents. It includes oligopeptides (Schäfer et al., 2011), glycoproteins (Bartlett, Su, Hildebrandt, Weber, & Davis, 2007; Salvati et al., 2013), saccharides (Gajbhiye & Gong, 2013; Wijagkanalan et al., 2011; Yamada et al., 2013), antibodies – whole (Zhu et al., 2012) or fragments (Suzuki, Takayanagi, & Shimizu, 2004), – aptamers (Kurosaki et al., 2012), other small molecules (Lee, H. et al., 2012; Sharma, Peetla, Adjei, & Labhasetwar, 2013), and their derivatives (Chou, Leng, Scaria, Woodle, & Mixson, 2011; Fakhari et al., 2011; Wang, M. & Thanou, 2010). Typically, numerous types of cancer cells have been reported to over-express cellular receptors that have been exploited as target biomarkers (Muthu & Singh, 2009; Wang, M. & Thanou, 2010), in order to limit off-target gene transfer to healthy cells (step 1 Figure 2-14). For instance, recent phase I clinical trials of siRNA gene therapy on human melanoma patients involved transferrin-decorated nanocarriers to target transferrin receptors (Davis et al., 2010).

Ligand-mediated targeting is thought to contribute to the overall process of nucleic acid delivery mainly in terms of nanocarrier uptake by target cells (Bartlett et al., 2007; Heidel & Davis, 2011) (step 2 Figure 2-14). The resulting organ and tumor biodistribution of targeted nanocarriers may be significantly improved when the EPR effect is limited (Taratula et al., 2009) (see Figure 2-16D), but that is not always the case (Bartlett et al., 2007). As reviewed by Heidel *et al.*, in several reported cases active targeting did not change the overall biodistribution of nanocarriers to the tumor, but, rather, it increased the fraction of nanocarriers inside cells (Heidel & Davis, 2011). The function of ligand-mediated targeting is thus quite focused, yet a serious

limitation may arise when the target receptor activation is not desired. For instance, the epidermal growth factor receptor (EGFR) – a cancer biomarker of the Erb receptor family – is correlated to mitotic activity; EGF-mediated targeting may activate the receptor signalling pathway, which may work against the treatment itself (Master & Sen Gupta, 2012; Schäfer et al., 2011). Here, a solution was recently evidenced by Schäfert *et al.*, who reported that the EGFR-specific peptide GE11 avoided unwanted subsequent signaling upon ligand-induced internalization of targeted PEI-based polyplexes while mediating effective targeting to EGFR-over-expressing cells (Schäfer et al., 2011).

Active targeting is now an established surface modification to enhance nanocarriers, although most reports on receptor-mediated non-viral gene delivery do not present any clear optimization of their ligand decoration parameters, such as ligand density, orientation or spacer length. Optimization studies focused on such parameters may yield valuable insight to potentiate active targeting strategies.

2.7.6.2 Cellular entry

Without any surface modification, most nanocarriers display an efficient cell uptake (Nel et al., 2009). The latter is caused by non-specific interactions that promote a close contact between the nanocarrier and the cell surface. Those interactions are mainly electrostatic: globally positive nanocarriers are attracted to the negatively charged cell membrane. The roughness of the nanocarrier surface modulates that process of cell adherence and uptake (Nel et al., 2009). Shielding strategies aim at reducing those non-specific adherence phenomena in order to improve both systemic half-life and targeting specificity. As a result, cellular entry can be substantially hampered, making room for surface decoration strategies addressing the latter (Huang et al., 2013), as a complement to surface coating strategies that were discussed earlier.

A decoration strategy addressing cell entry can be included within a targeting strategy. For example transferrin has been reported to be useful both for active targeting and cellular uptake (Banerjee et al., 2010; Davis et al., 2010). Yet some targeting molecules do not promote an adequate cellular entry, even though they provide specificity through receptor-binding on target cells. The internalization pathway of a given cell receptor may prove unfit to the nucleic acid delivery strategy, for instance if preferential routing towards lysosomal pathway occurs, as

illustrated in Figure 2-14. In order to control the internalization of the nanocarrier separately from the active targeting, the nanocarrier can be decorated with agents promoting cell entry, such as the helper lipid DOPE in lipid layer-containing nanocarriers, or fusogenic cell-penetrating peptides (CPP). This peptide family can interact non-specifically with cell membranes through several mechanisms that are still partially understood, making them a potent tool to improve the delivery of nanocarriers. Fusogenic CPP have several different origins, from natural protein transduction domains – *e.g.* the TAT peptide – to rational design – such as octaarginine, – and have been thoroughly reviewed (Bolhassani, 2011; Said Hassane et al., 2010). Huang *et al.* recently reviewed the innovative strategies implemented to optimize the use of cell-penetrating peptides. As CPP are non-specific, their use may result in a higher off-target cell entry. Thus, the CPP fusogenic activity should remain inactive until the nanocarrier gets in close vicinity to its target cells in order to mitigate off-target uptake and toxicity in healthy tissue (Bolhassani, 2011; Huang et al., 2013). Thus, the emerging environment-responsive nanocarriers arguably represent a way to capitalize on CPP.

Endocytosis has recently appeared to be a determinant pathway for the CPP-mediated uptake of non-viral nanocarriers; concomitantly, several fusogenic CPP-mediated uptake strategies have been reported to be limited by the next hurdle in the route towards cargo delivery, that is endosomal escape (Said Hassane et al., 2010).

2.7.6.3 Endosomal escape

Among the challenging series of barriers that make nucleic acid delivery complex, endosomal escape is one of the most pervasive for non-viral nanocarriers (see step 4 Figure 2-14), as a majority enter cells by endocytosis. For polymer-based nanocarriers, nucleic acid condensing agents such as PEI and other endosome buffering molecules have been tailored to promote endosomal escape (Pack et al., 2005). Lipid layer-displaying nanocarriers also benefit from membrane-permeation features (Tseng, Mozumdar, & Huang, 2009). As regards surface modifications, the main endosome-disruptive biomolecules used for the surface decoration of nanocarriers are endosomal escape peptides (EEP) (Moore, N. M., Sheppard, Barbour, & Sakiyama-Elbert, 2008). They can act through two main mechanisms. One mechanism is the endosome bursting upon swelling, which is triggered by the proton-sponge effect driven by histidine-rich peptides such as H5WYG (Moore, N. M. et al., 2008). The cationic nature of such

EEP can also be found in CPP. The other mechanism is based on conformational changes in the peptide secondary structure upon endolysosomal acidification. Cytotoxicity related to lipid bilayer destabilization provoked by such peptides has limited their use for *in vivo* studies (Said Hassane et al., 2010). Next generations of EEP implementations – *e.g.* activatable EEP – with reduced systemic activity and cytotoxicity may soon lift this barrier in the development of efficient non-viral gene nanocarriers.

2.7.6.4 Nuclear transport

Impaired nuclear translocation (see step 5 Figure 2-14) is an inevitable issue for plasmid DNA delivery, for the nuclear pore complexes do not enable passive diffusion of assemblies larger than a few dozen nanometers (Bolhassani, 2011; Breuzard et al., 2008). When fast-dividing cells are targeted for non-viral gene delivery, substantial nuclear translocation can happen upon nuclear membrane dissolution (Pack et al., 2005). Otherwise, nuclear localization signals (NLS) emerged as chaperones enhancing nuclear entry through active translocation across the nuclear envelope. NLS are peptide-based, although by extension other types of biomolecules – *e.g.* maltotriose (Akita, Masuda, et al., 2011) – can be considered NLS. Of interest, clustered basic lysine and arginine residues form a classic NLS peptide feature that can occur in fusogenic CPP and EEP as well. Thus, the nomenclature used to describe the peptides used for non-viral gene delivery is equivocal.

Finally, the NLS ligands included in the nanocarrier need to remain connected to the nucleic acid payload to efficiently chaperone the latter from the cytosol to the nucleus. That is why NLS are often directly part of the nucleic acid condensing agents themselves, yet in some cases NLS are conjugated onto the surface of nanocarriers (Akita, Masuda, et al., 2011), especially when they are included in a CPP like the TAT peptide (Kuai et al., 2011; Liu, C. et al., 2013; Roy et al., 2009; Zhu et al., 2012).

2.7.7 Design criteria for the tethering strategy

Many tethering strategies have been exploited to modify the surface of nanocarriers with specific molecules, such as PEG or receptor-targeting ligands. The key elements mediating their success are summarized in Box 2-2. First, the strength of the weakest link and its potential disrupting cue both have to be tuned to the bioactivity time frame of the molecule. For instance

the shielding activity of a hydrophilic coating in blood circulation may turn into an impediment past cellular entry (Amoozgar & Yeo, 2012). Conversely, a nuclear localization signal (NLS) has to be active only in the cytosol. Thus, labile chemical bonds such as disulfide bridges (Sun, W. & Davis, 2010) or hydrazones (Fella et al., 2008) have been used for PEGylation (see Table 2-5), but a non-cleavable ether bond was used to display maltotriose – an NLS – into the lipid envelope of a nanocarrier by Akita *et al.* (Akita, Masuda, et al., 2011). An important point in the design of a bioconjugation strategy is that the chosen releasing cue does not have to correspond to the grafting link *per se*: a responsive bond can be included along a spacer conjugated to the biomolecule beforehand. For example, Dash *et al.* included an enzymatically cleavable tetrapeptide sequence to their HMPA-based polymer and used the 4-nitrophenoxy group for surface conjugation to the pendant primary amino groups of PLL/DNA polyplexes (Dash et al., 2000). Shim *et al.* engineered a linear PEI onto which a third of the secondary amines were functionalized with a ketal-including short spacer terminated by a primary amino group. The latter was used to graft amine-reactive gold nanoparticles through a stable amide bond, thus effectively decoupling bioconjugation and controlled release (Shim et al., 2010).

Box 2-2: Key elements in the display of biomolecules on nanocarriers.

- The strength of the weakest link and its eventual disruptive cue
- The spacer length separating the biomolecule from the nanocarrier surface
- The biomolecule orientation regarding the bioavailability of its active sites
- The biomolecule density and repartition on the surface

Secondly, the length of the linker that separates a ligand from a nanocarrier surface may affect the bioavailability of the former. For instance, Ishitsuka *et al.* reported a 27-fold increase in gene expression upon switching from a 2-kDa down to a 0.9-kDa PEG spacer for the decoration of a nanocarrier with the cell-penetrating peptide IRQRRRR. The resulting assembly was injected *via* the tail vein of mice for transfection in the lung (Ishitsuka et al., 2011). They hypothesized that the increase in gene expression was due to a thinner hydrophilic layer separating the nanocarrier lipid envelope from the endosomal membrane of transfected cells, thus enabling a superior endosomal escape. Guiding principles for the adequate length of PEGylating agents are complex to elicit from the wide diversity of nanocarriers and applications tested, spacer length being strongly case-dependant (Wang, M. & Thanou, 2010).

Table 2-5: Range of interactions used in nanocarrier surface modification.

Short bond type	Example	Cleaving/disrupting cue (example)	Application	Limitation	Reference	
Covalent	non-cleavable	Thioester	Long lasting PEGylation	Low uptake and gene expression	(Sun, W. & Davis, 2010)	
	Covalent cleavable	Disulfide bridge	Reducer (glutathione)	dePEGylation after internalization	Premature dePEGylation, Nanocarrier aggregation	(Sun, W. & Davis, 2010)
		Hydrazone	Acidification (pH≤5)	Endosomal escape upon dePEGylation	Premature extracellular cleavage	(Fella et al., 2008)
		4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl cage	Light (UV radiation)	Localized activation	Therapeutic window for tissue penetration	(Dvir, Banghart, Timko, Langer, & Kohane, 2010)
	Ester	Enzyme (esterase)	Separation of nanocarriers from targeted receptor	Slow cleavage rate	(Chu, D. S., Johnson, & Pun, 2012)	
Non-covalent	Electrostatic	Poly propyl acrylic acid (PPAA)	pH-triggered neutralization (pH≤6)	Uncoating in early endosome, membrane disruptive activity	Limited nanocarrier systemic stability	(Lee, L. K. et al., 2006)
	Hydrophobic and electrostatic	DOPE/CHEMS lipid bilayer	pH-triggered phase transition (pH≤6)	Protection from extracellular polyanions, pH-triggered fusogenicity	Low systemic stability, Decreased fusogenicity upon PEGylation	(Lehtinen, Hyvonen, Subrizi, Bunjes, & Urtti, 2008)
	Host-guest	Cyclodextrin-adamantane		Well defined and controlled conjugation	Need for host display on the nanocarrier surface	(Bartlett & Davis, 2007)

Thirdly, the ligand orientation upon tethering is of importance, especially for larger biomolecules. Algar *et al.* emphasized the prevalence of this issue when using carbodiimide chemistry for protein conjugation (Algar et al., 2011): the probable presence of several reactive sites for carbodiimide cross-linking on the protein will statistically lead to one or more

subpopulations of tethered proteins with an inactivated or unavailable bioactive site. The use of unnatural amino acids for the preparation of polypeptides *in vitro* or *in vivo* through non-sense or frameshift codons such as the ketone-bearing p-acetylphenylalanine is an alternative to unspecific chemistries, although its use is still limited to a narrow range of applications (Kim, C. H. et al., 2013).

Finally, the ligand density and its repartition on the surface of the nanocarrier have been reported to affect the outcome of the tethering strategy. First, improved receptor targeting and cell uptake of decorated nanocarriers both have been correlated to an increase in average ligand density (Fortier et al., 2013; Stefanick, Ashley, Kiziltepe, & Bilgicer, 2013), but excessive density has also been reported to impair cell uptake. Furthermore, the repartition of ligands onto the surface is believed to be determinant. Lee *et al.* compared two well-defined ligand-decorated architectures with the same average density, but with different local densities (Lee, H. et al., 2012). Their nanocarrier triggered no significant gene silencing when ligands were more evenly distributed, and over 50% of silencing with a higher local ligand density. Cell uptake was similar for both nanocarriers; the authors hypothesized that intracellular trafficking was influenced by the ligand repartition. Other studies have proposed that appropriate ligand densities may yield a higher avidity, thus increasing uptake by cells (Bartlett & Davis, 2007; Ng et al., 2009), and pointed at clustered subpopulations of ligand.

Thus, the four major aspects for the display of ligands on nanocarriers listed in Box 2-2 should be cooperatively optimized in order to efficiently enhance gene delivery overall. Algar *et al.* discussed the potential of bioorthogonal chemistry for the bioconjugation of several nanoparticles in order to meet with such demanding goals. Additionally, Stephanopoulos and Francis recently published comprehensive heuristics on protein bioconjugation strategy that they included in their review on the decision process for bioconjugation (Stephanopoulos & Francis, 2011).

2.7.8 Combined surface modifications

As reviewed so far, a series of distinct hurdles slow down the advancement of gene therapies that rely on the systemic injection of non-viral nanocarriers. A large empirical evidence-based knowledge of these well-identified barriers has been built over hundreds of publications for several decades. There is now a range of specific strategies that are available to specifically address each of these barriers. Some agents have demonstrated multiple effects. For

instance, the TAT peptide is a CPP that includes an NLS (Roy et al., 2009), hyaluronic acid is a lateral stabilizer that targets CD44 receptors (Hattori et al., 2013), the GALA peptide is a pH-responsive EEP that has an affinity for sialic acid-terminated endothelial cell surface sugar chains (Kusumoto et al., 2013). Otherwise, the elaboration of multifunctional nanocarriers relies on the combination of several agents, the latter being often applied as surface modifications of pre-designed vectors.

2.7.8.1 Decorated coating

Coating a nanocarrier yields stabilized assembly, but that is often at the expense of reduced nanocarrier/cell interactions. Decorating a coated nanocarrier with a ligand being able to facilitate targeting, uptake and even endosomal escape is a classical way to mitigate that reduced nanocarrier/cell interaction. For instance, decoration of PEGylated nanocarriers, especially for targeting purposes, is an efficient rationale that benefits from extensive empirical data (Wang, M. & Thanou, 2010), even though general formulation rules are very limited. Spacer length is a subtle parameter to optimize on a given construct in order to yield a sufficient bioactivity without compromising other aspects of non-viral gene delivery. The dilemma is that conflicting principles coexist (see Table 2-6).

Table 2-6: Conflicting principles at stake for the decoration of PEGylated nanocarriers.

Optimization path	Advantage	Adverse effect
Spacer lengthening	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ligand still bioavailable after physiological protein corona formation (Salvati et al., 2013) ▪ Increased bioavailability away from the nanocarrier surface ▪ More flexibility to enhance binding to target 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Too intense ligand display may impair nanocarrier shielding and trigger opsonization (Cheng, Z., Al Zaki, Hui, Muzykantov, & Tsourkas, 2012) ▪ Additional spacer length may wrap around the ligand and bury it (Stefanick et al., 2013)
Spacer shortening	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Can be combined with triggered dePEGylation of longer chains in the vicinity of the target cells for a conditioned activation (Fella et al., 2008; Kuai et al., 2011; Zhu et al., 2012) ▪ Close vicinity between the nanocarrier and the endosomal membrane after endocytosis may promote escape to the cytosol (Ishitsuka et al., 2011) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ligand may be remain buried into the surrounding residual PEG chains and stay inactive ▪ Excessive steric hindrance from the nanocarrier surface may prevent binding to target

Conversely, Stefanick *et al.* recently published a detailed study on the decorated coating of liposomes for targeting purposes. The authors reported that the length of the linker used for decoration had a dramatic influence on cell uptake, whereby excessive length completely abolished the peptide targeting ability for a given PEGylation thickness (see Figure 2-17A). Furthermore, the cell uptake was found to plateau at around the same ligand density for two different target cell lines (Figure 2-17B) as well as for another disease model involving different peptides and target cells *in vitro*. Figure 2-17C illustrates the utter importance of optimizing these design parameters (Stefanick *et al.*, 2013).

2.7.8.2 Multiplex decoration

When several different decoration ligands are tethered onto the surface of nanocarriers, a multiplex decoration is obtained; the purpose of which can be to address sequential barriers to systemic delivery. For example, Akita *et al.* recently studied the synergistic effects of the fusogenic peptide GALA and the nuclear localization signal maltotriose by anchoring them both onto the lipid bilayers of their nanocarrier (Akita, Masuda, *et al.*, 2011). *In vivo* experiments were carried out on mice by intravenous injection of a small volume of highly concentrated nanocarrier suspension. Both GALA and maltotriose decorations sequentially yielded an increase by an order of magnitude in reported gene expression in the liver after 6 hours. The authors postulated that GALA and maltotriose only played a role for endosomal escape and nuclear transfer respectively in an independent manner. Cheng *et al.* observed a cross-talk between their two ligands – a CPP and folate – for the cellular attachment of their nanocarrier onto folate-receptor-bearing KB cells. The authors postulated that avidity effects emanating from both ligands yielded synergistic effects for cell binding and uptake both *in vitro* and *in vivo* (Cheng, C. J. & Saltzman, 2011).

Another purpose for multiplex decoration is to target several cell lines. Jing *et al.* recently reported a dual decoration strategy, whereby they managed to target two different cell lines from a single homogenized nanocarrier injection in tumor-bearing mice. Transferrin was used to target HepG2, a human liver carcinoma cell line; and mannan was used to target Kupffer cells (Jing, Li, Liu, Wang, & Sui, 2013). The dual decorated nanocarriers yielded transfection levels as high as both single decorated formulations did for their specific target cell populations.

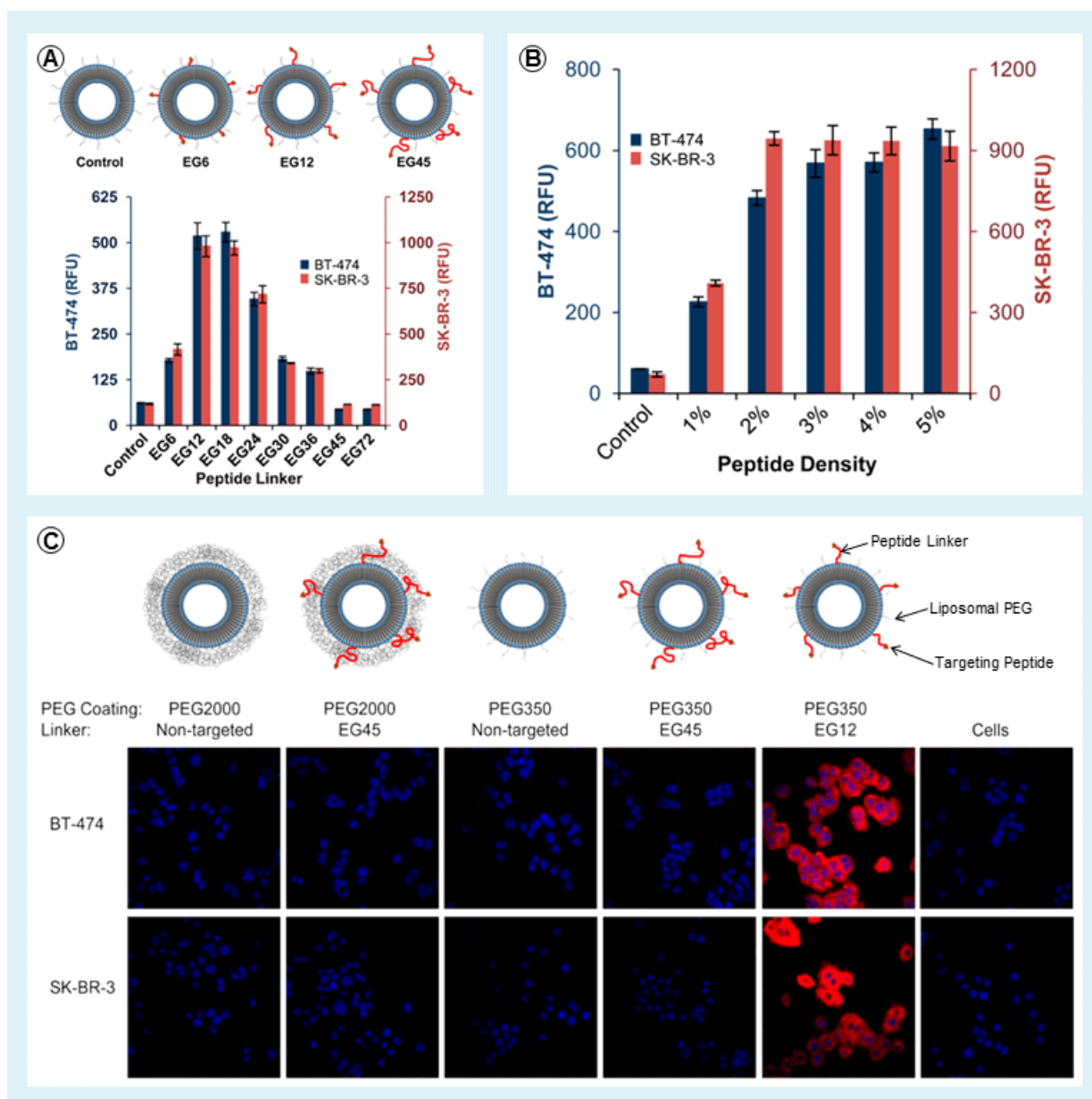


Figure 2-17: Effect of liposomal PEG coating and peptide EG-linker length on the cellular uptake of HER2-targeted liposomes in two HER2-overexpressing cell lines. (A) Bell-shaped dependence of cell uptake with EG-linker length. (B) Evidence of a targeting peptide density threshold for cell uptake. Peptide density percentage corresponds to the molar fraction of lipid anchor in the lipid layer (C) Confocal microscopy images taken 3 h post transfection. Nuclei are in blue, liposomes in red.

EG: ethylene glycol; HER2: Human epidermal growth factor receptor 2;

Reproduced with permission from (Stefanick et al., 2013).

Thirdly, reduced off-target effects can be achieved by dual ligand targeting to the same cell type. For instance, Kluza *et al.* targeted liposomes to newly formed endothelium by decorating their liposomes with both cyclic RGD and angiotensin peptides. The former targeted $\alpha_v\beta_3$ integrins, and the latter targeted galectin-1, both present on activated endothelial cells. This dual decoration strategy yielded synergistic targeting and uptake of liposomes *in vitro* by activated endothelial cells; thus it can potentially reduce off-target to cells bearing only one of the target receptors (Kluza et al., 2010).

2.7.8.3 Multi-layered construction

Another level of surface modification can be achieved through multi-layered assemblies. An advantage of multi-layers is the increased loading capacity available per carrier. For example, Li *et al.* coated their positively-charged DNA/protamine core nanocarrier with an additional 15-nm thick plasmid DNA layer. On a subsequent step, a cationic lipid was auto-assembled onto the surface, and the latter was ultimately coated by *o*-carboxymethylated chitosan, a pH-sensitive hydrophilic polymer (Li et al., 2012). The authors' layer-by-layer technique yielded well defined nanocarriers. *In vitro* and *in vivo* studies provided encouraging results on the specific role performed by each component: a hydrophilic coating for a long circulation time, fusogenic lipids for endosomal escape, and NLS for nuclear transport.

Such multi-layered assemblies have also been designed to co-encapsulate a chemotherapeutic agent and nucleic acids. The motivation for this rationale is to address multi-drug resistance (MDR) often encountered in cancer chemotherapy. Nanoscale combination therapy applied to address MDR in cancer treatment has recently been reviewed by Khan *et al.* (Khan, Ong, Wiradharma, Attia, & Yang, 2012). A property worth harnessing when dealing with multiple cargos is their controlled release, so that each pharmaceutical can better act on its own target.

2.7.8.4 Advanced controlled release systems

As numerous non-viral gene delivery barriers are sequential (see Figure 2-13 and Figure 2-14), the corresponding nanocarrier features that address them may only be needed for a specific time frame. Hence, controlled uncoating strategies have been envisioned in order to either trigger the release of already used materials from the surface of the nanocarrier, or to set on another

bioactive compound. This paradigm is now implemented in most recent PEGylation strategies (see Table 2-5). Huang *et al.* reviewed this rationale for the optimized decoration of nanocarriers with CPP, as the latter non-selective cell-penetrating abilities are to be avoided until target cells are reached.

DePEGylation is not the only surface controlled release application. Taratula *et al.* developed a reducible caging strategy for their nanocarrier but did not implement any dePEGylation (Taratula *et al.*, 2009). In their experiments, the nanocarrier uncaging in endolysosomal compartments, which was triggered by reductive species, was sufficient to release the cargo siRNA in the cytosol for subsequent gene silencing (see Figure 2-16). Thus, the authors managed to optimize the biodistribution of their nanocarrier *in vivo* owing to their highly serum stable construct.

A broad range of cues have been explored for controlled release. Cues can be of environmental origin. That includes acidification, reduction and specific enzymes. Conversely, external cues applied locally have also been developed. They include light, ultrasound, heat and magnetic fields. Nanocarriers responding to stimuli have been reviewed by Fleige *et al.* (Fleige, Quadir, & Haag, 2012).

2.7.9 Future perspectives

There is a duality in the progress of non-viral nucleic acid nanocarriers. Particularly complex assemblies with multiple features but having no clinical future coexist along frugal formulations with which clinicians struggle to make the awaited gene therapy revolution a reality.

On the one hand there is the upstream fundamental point of view: the numerous barriers to be overcome in gene delivery all have specific strategies addressing them. A methodical optimization should be carried out through an advanced decoupling of every single nanocarrier feature in order to gain indispensable knowledge and understanding of both specific and global governing principles and processes. An insightful example of methodical optimization is the recently published study of Stefanick *et al.* on the decorated coating of liposomes described earlier (Stefanick *et al.*, 2013).

On the other hand, the focus also has to be directed on regulatory requirements, clinical relevance and treatment accessibility. Efforts in simplicity, robustness, cost-effectiveness and

clinical efficacy have to be made in order to go towards applicable nanomedicines. An elegant outcome of these principles is the recently initiated clinical trials based on a liposome-vectorized microRNA for liver cancer: the adequate formulations of four different lipids forms liposomes with a negative surface charge at physiological pH, which becomes positively charged in acidic tumor environment, thus enhancing local uptake by cancer cells (Bader, 2012). The breakthrough works of Davis *et al.* on the first clinical trials for siRNA therapy through the use of active targeting are also remarkable tangible steps towards clinical success of non-viral nucleic acid delivery (Davis et al., 2010). Both directions should be actively pursued as they are intrinsically bound together even though their specific outcome is of a different nature.

Apparent paradoxes can also be found among contradictory opinions towards the use of targeting ligands (Lammers, Kiessling, Hennink, & Storm, 2012). This stems from the fact that generalizations made over a myriad of therapeutic applications are likely to include numerous exceptions. For example, the EPR effect for the passive targeting of solid tumor tissue may actually be hampered by the active targeting mediated by ligand decoration. The latter may indeed compromise the nanocarrier shielding, or mediate off-target to cognate receptor-bearing healthy cells. Both effects may in turn reduce the nanocarrier systemic half-life that directly fuels the EPR effect (Cheng, Z. et al., 2012; Lammers et al., 2012). Conversely, active targeting may prove capital for other, more critical applications such as metastasized carcinomas, or when no significant EPR effect can be tapped (Lammers et al., 2012). Similar divergences have been discussed regarding nanotheranostics, that is nanomedicines combined with diagnostics modalities (Cheng, Z. et al., 2012). We believe that given the variety of the need for nanomedicines, all these prospective designs have their range of applications tied with specific criticalities,

Finally, complexity does not have to be systematically avoided in non-viral gene delivery. Rather, future systems with increased complexity will have to bring about substantial enhancements in clinical efficacy. This stems from the fact that some levels of complexity are inherent to potentially clinically relevant strategies, with the example of combination therapies addressing MDR in cancer treatment. The limitations of monotherapies and the substantial advantages of coupling drug and gene therapies in a single formulation is an exciting new paradigm that will probably be the subject of outstanding research in the near future (Cheng, Z. et al., 2012; Farokhzad & Langer, 2009; Lammers et al., 2012).

Executive summary

Box 2-3: Executive summary

The nanocarrier surface

- Surface and core of nanocarriers bear specific properties and corresponding goals in gene delivery.
- Both are tied with different time frames, and thus need to be addressed separately.
- A nanocarrier surface is a dynamic and transient feature critically involved in the fate of the nanocarrier *in vivo*.
- Its modification can be carried out before, during, or after the formation of the surface.
- Whole surface coating and discrete ligand decoration form the two main surface modification approaches.

Surface coating

- The physico-chemical identity of the nanocarrier surface can be controlled by coating the latter with an additional agent.
- Monovalent coating is a well-characterized technique that provides steric stabilization, a critical feature involved in salt- and serum-stability.
- Multivalent coating confers lateral stabilization to the assembly by means of physical or chemical cross-linking on the surface of the nanocarrier.
- Several surface coatings additionally address delivery barriers including specific cell uptake, endosomal escape and nucleic acid cargo unpacking.
- A range of polymer/lipid hybrid systems capitalize on the attractive properties of surface lipid layers by anchoring them on a solid or semi-solid core that confers a greater stability.

Surface decoration

- The biological identity of the nanocarrier surface can be tuned by decorating the latter with bioactive molecules. Surface decoration can address four major types of applications:
- Active targeting to specific cell lines can be promoted by displaying molecules such as ligands that can bind to target cell receptors.
- Decoration with membrane-active compounds can favor uptake by cells.
- Impaired endosomal escape can be restored either with endosome-buffering or fusogenic agents.
- Intracellular trafficking and especially nuclear transport can be influenced by displaying signalling molecules such as NLS.

Design criteria for the tethering strategy

- Decoupling tethering and controlled release in surface modification strategies brings flexibility to the design.
- The length of the linker can influence greatly the activity of the tethered molecule in a case-specific fashion.
- The coupling method may affect the orientation of tethered molecules, which in turn modulates their activity in the biological milieu.
- Local higher tethered ligand densities promote avidity effects that can enhance targeting, uptake by cells, and intracellular trafficking.

Combined surface modifications

- Multifunctional surface modifications can include both decorations and coatings in a single to multiple layer assembly.
- Multiplex decoration can broaden cell targeting and uptake options.
- Advanced controlled release features enable the activation of several functions at relevant time frames.

Future perspective

- Decoupling the different nanocarrier features is critical to gain a better knowledge and understanding of the driving forces behind an efficient gene delivery.
- Conversely, efforts need to be made towards more scalable, economical, and clinically relevant formulations.

2.7.10 Financial & competing interests disclosure

This work was supported by funding from the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (C.F.) and from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (G.D.C. and C.F.). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties. We are grateful for the insightful comments from Samantha Noël. No writing assistance was utilized in the production of this manuscript. Figures were produced using [Servier Medical Art](#).

2.7.11 References

Papers of special note have been highlighted as:

* **of interest**

** **of considerable interest**

- Akita, H., Masuda, T., Nishio, T., Niikura, K., Ijiro, K., & Harashima, H. (2011). Improving in Vivo Hepatic Transfection Activity by Controlling Intracellular Trafficking: The Function of GALA and Maltotriose. *Mol. Pharm.*, 8(4), 1436-1442. doi: 10.1021/mp200189s
- Algar, W. R., Prasuhn, D. E., Stewart, M. H., Jennings, T. L., Blanco-Canosa, J. B., Dawson, P. E., & Medintz, I. L. (2011). The controlled display of biomolecules on nanoparticles: a challenge suited to bioorthogonal chemistry. [review]. *Bioconjug. Chem.*, 22(5), 825-858. doi: 10.1021/bc200065z
- Amoozgar, Z., & Yeo, Y. (2012). Recent advances in stealth coating of nanoparticle drug delivery systems. [review]. *Wiley Interdiscip. Rev.-Nanomed. Nanobiotechnol.*, 4(2), 219-233. doi: 10.1002/wnan.1157
- Bader, A. G. (2012). miR-34 – A microRNA Replacement Therapy Is Headed to the Clinic. [review]. *Front. Genet.*, 3. doi: 10.3389/fgene.2012.00120

- Banerjee, D., Liu, A. P., Voss, N. R., Schmid, S. L., & Finn, M. G. (2010). Multivalent display and receptor-mediated endocytosis of transferrin on virus-like particles. *ChemBioChem*, 11(9), 1273-1279. doi: 10.1002/cbic.201000125
- Bartlett, D. W., & Davis, M. E. (2007). Physicochemical and biological characterization of targeted, nucleic acid-containing nanoparticles. *Bioconjug. Chem.*, 18(2), 456-468. doi: 10.1021/bc0603539
- Bartlett, D. W., Su, H., Hildebrandt, I. J., Weber, W. A., & Davis, M. E. (2007). Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality in vivo imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(39), 15549-15554. doi: 10.1073/pnas.0707461104
- Bolhassani, A. (2011). Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. [review]. *Biochim. Biophys. Acta*, 1816(2), 232-246. doi: 10.1016/j.bbcan.2011.07.006
- Breuzard, G., Tertilt, M., Goncalves, C., Cheradame, H., Geguan, P., Pichon, C., & Midoux, P. (2008). Nuclear delivery of NFkappaB-assisted DNA/polymer complexes: plasmid DNA quantitation by confocal laser scanning microscopy and evidence of nuclear polyplexes by FRET imaging. *Nucleic Acids Res.*, 36(12), e71. doi: 10.1093/nar/gkn287
- Cheng, C. J., & Saltzman, W. M. (2011). Enhanced siRNA delivery into cells by exploiting the synergy between targeting ligands and cell-penetrating peptides. *Biomaterials*, 32(26), 6194-6203. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.04.053
- Cheng, Z., Al Zaki, A., Hui, J. Z., Muzykantov, V. R., & Tsourkas, A. (2012). Multifunctional Nanoparticles: Cost Versus Benefit of Adding Targeting and Imaging Capabilities. [review]. *Science*, 338(6109), 903-910. doi: 10.1126/science.1226338
- ** Gives a well-balanced overview of the pros and cons of complexity in the design of nanocarriers. Points are justified in terms of technical and economic feasibility, specificity of applications, diverging but complementary outcomes, and regulation.**
- Chou, S. T., Leng, Q., Scaria, P., Woodle, M., & Mixson, A. J. (2011). Selective modification of HK peptides enhances siRNA silencing of tumor targets in vivo. *Cancer Gene Ther.*, 18(10), 707-716. doi: 10.1038/cgt.2011.40

- Chu, D. S., Johnson, R. N., & Pun, S. H. (2012). Cathepsin B-sensitive polymers for compartment-specific degradation and nucleic acid release. *J. Control. Release*, 157(3), 445-454. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.10.016
- Dash, P. R., Read, M. L., Fisher, K. D., Howard, K. A., Wolfert, M., Oupicky, D., . . . Seymour, L. W. (2000). Decreased binding to proteins and cells of polymeric gene delivery vectors surface modified with a multivalent hydrophilic polymer and retargeting through attachment of transferrin. *J. Biol. Chem.*, 275(6), 3793-3802. doi: 10.1074/jbc.275.6.3793
- Davis, M. E., Zuckerman, J. E., Choi, C. H., Seligson, D., Tolcher, A., Alabi, C. A., . . . Ribas, A. (2010). Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature*, 464(7291), 1067-1070. doi: 10.1038/nature08956
- Dvir, T., Banghart, M. R., Timko, B. P., Langer, R., & Kohane, D. S. (2010). Photo-targeted nanoparticles. *Nano Lett.*, 10(1), 250-254. doi: 10.1021/nl903411s
- Erbacher, P., Bettinger, T., Belguise-Valladier, P., Zou, S., Coll, J. L., Behr, J. P., & Remy, J. S. (1999). Transfection and physical properties of various saccharide, poly(ethylene glycol), and antibody-derivatized polyethylenimines (PEI). *J. Gene Med.*, 1(3), 210-222. doi: 10.1002/(sici)1521-2254(199905/06)1:3<210::aid-jgm30>3.0.co;2-u
- Fakhari, A., Baoum, A., Siahaan, T. J., Le, K. B., & Berkland, C. (2011). Controlling ligand surface density optimizes nanoparticle binding to ICAM-1. *J. Pharm. Sci.*, 100(3), 1045-1056. doi: 10.1002/jps.22342
- Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2009). Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. [review]. *ACS Nano*, 3(1), 16-20. doi: 10.1021/nn900002m
- Fella, C., Walker, G. F., Ogris, M., & Wagner, E. (2008). Amine-reactive pyridylhydrazone-based PEG reagents for pH-reversible PEI polyplex shielding. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 34(4-5), 309-320. doi: 10.1016/j.ejps.2008.05.004
- Fitzsimmons, R. E., & Uludag, H. (2012). Specific effects of PEGylation on gene delivery efficacy of polyethylenimine: interplay between PEG substitution and N/P ratio. *Acta Biomater.*, 8(11), 3941-3955. doi: 10.1016/j.actbio.2012.07.015

- Fleige, E., Quadir, M. A., & Haag, R. (2012). Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for the controlled transport of active compounds: Concepts and applications. [review]. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 64(9), 866-884. doi: 10.1016/j.addr.2012.01.020
- Fortier, C., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2013). A versatile coiled-coil tethering system for the oriented display of ligands on nanocarriers for targeted gene delivery. *Biomaterials*, 34(4), 1344-1353. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.047
- Gajbhiye, V., & Gong, S. (2013). Lectin functionalized nanocarriers for gene delivery. [review]. *Biotechnol. Adv.*, 31(5), 552-562. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.01.005
- Glover, D. J., Lipps, H. J., & Jans, D. A. (2005). Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. [review]. *Nat. Rev. Genet.*, 6(4), 299-310. doi: 10.1038/nrg1577
- Harris, T. J., Green, J. J., Fung, P. W., Langer, R., Anderson, D. G., & Bhatia, S. N. (2010). Tissue-specific gene delivery via nanoparticle coating. *Biomaterials*, 31(5), 998-1006. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.10.012
- Hattori, Y., Yamasaku, H., & Maitani, Y. (2013). Anionic polymer-coated lipoplex for safe gene delivery into tumor by systemic injection. *J. Drug Target.*, 21(7), 639-647. doi: 10.3109/1061186x.2013.789035
- Heidel, J. D., & Davis, M. E. (2011). Clinical developments in nanotechnology for cancer therapy. [review]. *Pharm. Res.*, 28(2), 187-199. doi: 10.1007/s11095-010-0178-7
- Honig, D., DeRouchey, J., Jungmann, R., Koch, C., Plank, C., & Radler, J. O. (2010). Biophysical characterization of copolymer-protected gene vectors. *Biomacromolecules*, 11(7), 1802-1809. doi: 10.1021/bm1002569
- Hu, C.-M. J., Zhang, L., Aryal, S., Cheung, C., Fang, R. H., & Zhang, L. (2011). Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(27), 10980-10985. doi: 10.1073/pnas.1106634108
- Huang, Y., Jiang, Y., Wang, H., Wang, J., Shin, M. C., Byun, Y., . . . Yang, V. C. (2013). Curb challenges of the "Trojan Horse" approach: Smart strategies in achieving effective yet safe cell-penetrating peptide-based drug delivery. [review]. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 65(10), 1299-1315. doi: 10.1016/j.addr.2012.11.007

- * **Presents numerous ingenious approaches in the design of nanocarriers with non-specific cell-penetrating peptides that still display high selectivity.**

- Ishitsuka, T., Akita, H., & Harashima, H. (2011). Functional improvement of an IRQ-PEG-MEND for delivering genes to the lung. *J. Control. Release*, 154(1), 77-83. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.05.012
- Ito, T., Yoshihara, C., Hamada, K., & Koyama, Y. (2010). DNA/polyethyleneimine/hyaluronic acid small complex particles and tumor suppression in mice. *Biomaterials*, 31(10), 2912-2918. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.12.032
- Jain, S., Kumar, S., Agrawal, A. K., Thanki, K., & Banerjee, U. C. (2013). Enhanced transfection efficiency and reduced cytotoxicity of novel lipid-polymer hybrid nanoplexes. *Mol. Pharm.*, 10(6), 2416-2425. doi: 10.1021/mp400036w
- Jing, F., Li, J., Liu, D., Wang, C., & Sui, Z. (2013). Dual ligands modified double targeted nano-system for liver targeted gene delivery. *Pharm. Biol.*, 51(5), 643-649. doi: 10.3109/13880209.2012.761245
- Jokerst, J. V., Lobovkina, T., Zare, R. N., & Gambhir, S. S. (2011). Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. [review]. *Nanomedicine*, 6(4), 715-728. doi: 10.2217/nnm.11.19
- Kasper, J. C., Troiber, C., Kuchler, S., Wagner, E., & Friess, W. (2013). Formulation development of lyophilized, long-term stable siRNA/oligoaminoamide polyplexes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 85(2), 294-305. doi: 10.1016/j.ejpb.2013.05.010
- Khan, M., Ong, Z. Y., Wiradharma, N., Attia, A. B., & Yang, Y. Y. (2012). Advanced materials for co-delivery of drugs and genes in cancer therapy. [review]. *Adv. Healthcare Mater.*, 1(4), 373-392. doi: 10.1002/adhm.201200109
- Kim, C. H., Axup, J. Y., & Schultz, P. G. (2013). Protein conjugation with genetically encoded unnatural amino acids. [review]. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 17(3), 412-419. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.04.017
- Kluza, E., van der Schaft, D. W. J., Hautvast, P. A. I., Mulder, W. J. M., Mayo, K. H., Griffioen, A. W., . . . Nicolay, K. (2010). Synergistic Targeting of $\alpha v \beta 3$ Integrin and Galectin-1 with Heteromultivalent Paramagnetic Liposomes for Combined MR Imaging and Treatment of Angiogenesis. *Nano Lett.*, 10(1), 52-58. doi: 10.1021/nl902659g

* **Demonstrated the synergistic effects of dual targeting to a single cell line in order to decrease off-target nanocarrier uptake.**

- Kuai, R., Yuan, W., Li, W., Qin, Y., Tang, J., Yuan, M., . . . He, Q. (2011). Targeted delivery of cargoes into a murine solid tumor by a cell-penetrating peptide and cleavable poly(ethylene glycol) comodified liposomal delivery system via systemic administration. *Mol. Pharm.*, 8(6), 2151-2161. doi: 10.1021/mp200100f
- Kurosaki, T., Higuchi, N., Kawakami, S., Higuchi, Y., Nakamura, T., Kitahara, T., . . . Sasaki, H. (2012). Self-assemble gene delivery system for molecular targeting using nucleic acid aptamer. *Gene*, 491(2), 205-209. doi: 10.1016/j.gene.2011.09.021
- Kusumoto, K., Akita, H., Ishitsuka, T., Matsumoto, Y., Nomoto, T., Furukawa, R., . . . Harashima, H. (2013). A Lipid Envelope-Type Nano Particle Incorporating a Multifunctional Peptide for the Systemic siRNA Delivery to the Pulmonary Endothelium. *ACS Nano*, 7(9), 7534-7541. doi: 10.1021/nn401317t
- Laga, R., Carlisle, R., Tangney, M., Ulbrich, K., & Seymour, L. W. (2012). Polymer coatings for delivery of nucleic acid therapeutics. [review]. *J. Control. Release*, 161(2), 537-553. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.02.013
- Lammers, T., Kiessling, F., Hennink, W. E., & Storm, G. (2012). Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. [review]. *J. Control. Release*, 161(2), 175-187. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.09.063
- Lee, H., Lytton-Jean, A. K., Chen, Y., Love, K. T., Park, A. I., Karagiannis, E. D., . . . Anderson, D. G. (2012). Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted in vivo siRNA delivery. *Nat. Nano.*, 7(6), 389-393. doi: 10.1038/nnano.2012.73
- Lee, L. K., Williams, C. L., Devore, D., & Roth, C. M. (2006). Poly(propylacrylic acid) enhances cationic lipid-mediated delivery of antisense oligonucleotides. *Biomacromolecules*, 7(5), 1502-1508. doi: 10.1021/bm060114o
- Lehtinen, J., Hyvonen, Z., Subrizi, A., Bunjes, H., & Urtti, A. (2008). Glycosaminoglycan-resistant and pH-sensitive lipid-coated DNA complexes produced by detergent removal method. *J. Control. Release*, 131(2), 145-149. doi: 10.1016/j.jconrel.2008.07.018

- Li, P., Liu, D., Miao, L., Liu, C., Sun, X., Liu, Y., & Zhang, N. (2012). A pH-sensitive multifunctional gene carrier assembled via layer-by-layer technique for efficient gene delivery. *Int. J. Nanomed.*, 7, 925-939. doi: 10.2147/ijn.s26955
- Liu, C., Liu, F., Feng, L., Li, M., Zhang, J., & Zhang, N. (2013). The targeted co-delivery of DNA and doxorubicin to tumor cells via multifunctional PEI-PEG based nanoparticles. *Biomaterials*, 34(10), 2547-2564. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.12.038
- Liu, M., Li, Z. H., Xu, F. J., Lai, L. H., Wang, Q. Q., Tang, G. P., & Yang, W. T. (2011). An oligopeptide ligand-mediated therapeutic gene nanocomplex for liver cancer-targeted therapy. *Biomaterials*. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.11.082
- Mandal, B., Bhattacharjee, H., Mittal, N., Sah, H., Balabathula, P., Thoma, L. A., & Wood, G. C. (2013). Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. [review]. *Nanomed.-Nanotechnol.*, 9(4), 474-491. doi: 10.1016/j.nano.2012.11.010
- Mao, S., Neu, M., Germershaus, O., Merkel, O., Sitterberg, J., Bakowsky, U., & Kissel, T. (2006). Influence of polyethylene glycol chain length on the physicochemical and biological properties of poly(ethylene imine)-graft-poly(ethylene glycol) block copolymer/SiRNA polyplexes. *Bioconjug. Chem.*, 17(5), 1209-1218. doi: 10.1021/bc060129j
- Master, A. M., & Sen Gupta, A. (2012). EGF receptor-targeted nanocarriers for enhanced cancer treatment. [review]. *Nanomedicine*, 7(12), 1895-1906. doi: 10.2217/nnm.12.160
- Moore, N. M., Sheppard, C. L., Barbour, T. R., & Sakiyama-Elbert, S. E. (2008). The effect of endosomal escape peptides on in vitro gene delivery of polyethylene glycol-based vehicles. *J. Gene Med.*, 10(10), 1134-1149. doi: 10.1002/jgm.1234
- Mueller, C., & Flotte, T. R. (2008). Clinical gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors. [review]. *Gene therapy*, 15(11), 858-863. doi: 10.1038/gt.2008.68
- Muthu, M. S., & Singh, S. (2009). Targeted nanomedicines: effective treatment modalities for cancer, AIDS and brain disorders. [review]. *Nanomedicine*, 4(1), 105-118. doi: 10.2217/17435889.4.1.105
- Nakamura, K., Yamashita, K., Itoh, Y., Yoshino, K., Nozawa, S., & Kasukawa, H. (2012). Comparative studies of polyethylene glycol-modified liposomes prepared using different

PEG-modification methods. *Biochim. Biophys. Acta*, 1818(11), 2801-2807. doi: 10.1016/j.bbamem.2012.06.019

Nel, A. E., Madler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M., Somasundaran, P., . . . Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. [review]. *Nat. Mater.*, 8(7), 543-557. doi: 10.1038/nmat2442

**** Presents a comprehensive overview of the stakes and the mechanisms operating at the level of the nanocarrier dynamic interface with the biological environment.**

Ng, Q. K. T., Sutton, M. K., Soonsawad, P., Xing, L., Cheng, H., & Segura, T. (2009). Engineering Clustered Ligand Binding Into Nonviral Vectors: [alpha]v[beta]3 Targeting as an Example. *Mol. Ther.*, 17(5), 828-836. doi: 10.1038/mt.2009.11

Nishiyama, N., Iriyama, A., Jang, W. D., Miyata, K., Itaka, K., Inoue, Y., . . . Kataoka, K. (2005). Light-induced gene transfer from packaged DNA enveloped in a dendrimeric photosensitizer. *Nat. Mater.*, 4(12), 934-941. doi: 10.1038/nmat1524

Oupicky, D., Ogris, M., Howard, K. A., Dash, P. R., Ulbrich, K., & Seymour, L. W. (2002). Importance of lateral and steric stabilization of polyelectrolyte gene delivery vectors for extended systemic circulation. *Mol. Ther.*, 5(4), 463-472. doi: 10.1006/mthe.2002.0568

Pack, D. W., Hoffman, A. S., Pun, S., & Stayton, P. S. (2005). Design and development of polymers for gene delivery. [review]. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 4(7), 581-593. doi: 10.1038/nrd1775

Peeters, L., Sanders, N. N., Jones, A., Demeester, J., & De Smedt, S. C. (2007). Post-pegylated lipoplexes are promising vehicles for gene delivery in RPE cells. *J. Control. Release*, 121(3), 208-217. doi: 10.1016/j.jconrel.2007.05.033

Romberg, B., Oussoren, C., Snel, C. J., Carstens, M. G., Hennink, W. E., & Storm, G. (2007). Pharmacokinetics of poly(hydroxyethyl-L-asparagine)-coated liposomes is superior over that of PEG-coated liposomes at low lipid dose and upon repeated administration. *Biochim. Biophys. Acta*, 1768(3), 737-743. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.12.005

Roy, R., Jerry, D. J., & Thayumanavan, S. (2009). Virus-inspired approach to nonviral gene delivery vehicles. *Biomacromolecules*, 10(8), 2189-2193. doi: 10.1021/bm900370p

- Russ, V., Frohlich, T., Li, Y., Halama, A., Ogris, M., & Wagner, E. (2010). Improved in vivo gene transfer into tumor tissue by stabilization of pseudodendritic oligoethylenimine-based polyplexes. *J. Gene Med.*, 12(2), 180-193. doi: 10.1002/jgm.1430
- Said Hassane, F., Saleh, A. F., Abes, R., Gait, M. J., & Lebleu, B. (2010). Cell penetrating peptides: overview and applications to the delivery of oligonucleotides. [review]. *Cell Mol. Life Sci.*, 67(5), 715-726. doi: 10.1007/s00018-009-0186-0
- Sakae, M., Ito, T., Yoshihara, C., Iida-Tanaka, N., Yanagie, H., Eriguchi, M., & Koyama, Y. (2008). Highly efficient in vivo gene transfection by plasmid/PEI complexes coated by anionic PEG derivatives bearing carboxyl groups and RGD peptide. *Biomed. Pharmacother.*, 62(7), 448-453. doi: 10.1016/j.biopha.2007.12.009
- Salvati, A., Pitek, A. S., Monopoli, M. P., Prapainop, K., Bombelli, F. B., Hristov, D. R., . . . Dawson, K. A. (2013). Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nat. Nano.*, 8(2), 137-143. doi: 10.1038/nnano.2012.237
- * **Demonstrated the influence of protein corona formation around nanocarriers on their binding and uptake capability, hence the importance of studying nanocarriers *in vitro* using relevant biological fluids.**
- Schäfer, A., Pahnke, A., Schaffert, D., van Weerden, W. M., de Ridder, C. M., Rodl, W., . . . Ogris, M. (2011). Disconnecting the Yin and Yang Relation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-Mediated Delivery: A Fully Synthetic, EGFR-Targeted Gene Transfer System Avoiding Receptor Activation. *Hum. Gene Ther.*, 22, 1463-1473. doi: 10.1089/hum.2010.231
- Sharma, B., Peetla, C., Adjei, I. M., & Labhasetwar, V. (2013). Selective biophysical interactions of surface modified nanoparticles with cancer cell lipids improve tumor targeting and gene therapy. *Cancer Lett.*, 334(2), 228-236. doi: 10.1016/j.canlet.2013.03.011
- Shen, M., Gong, F., Pang, P., Zhu, K., Meng, X., Wu, C., . . . Shuai, X. (2012). An MRI-visible non-viral vector for targeted Bcl-2 siRNA delivery to neuroblastoma. *Int. J. Nanomed.*, 7, 3319-3332. doi: 10.2147/ijn.s32900

Shim, M. S., Kim, C. S., Ahn, Y. C., Chen, Z., & Kwon, Y. J. (2010). Combined multimodal optical imaging and targeted gene silencing using stimuli-transforming nanotheragnostics. *J. Am. Chem. Soc.*, 132(24), 8316-8324. doi: 10.1021/ja100580y

Shmueli, R. B., Anderson, D. G., & Green, J. J. (2010). Electrostatic surface modifications to improve gene delivery. [review]. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 7(4), 535-550. doi: doi:10.1517/17425241003603653

Stefanick, J. F., Ashley, J. D., Kiziltepe, T., & Bilgicer, B. (2013). A systematic analysis of peptide linker length and liposomal polyethylene glycol coating on cellular uptake of peptide-targeted liposomes. *ACS Nano*, 7(4), 2935-2947. doi: 10.1021/nn305663e

**** A rigorous systematic study on the structure/function relationship between the length of both PEGylation and PEG spacers and receptor-mediated nanocarrier uptake.**

Stephanopoulos, N., & Francis, M. B. (2011). Choosing an effective protein bioconjugation strategy. [review]. *Nat. Chem. Biol.*, 7(12), 876-884. doi: 10.1038/nchembio.720

*** Provides useful tools and principles to design adequate bioconjugation strategies in multi-criteria applications.**

Sun, W., & Davis, P. B. (2010). Reducible DNA nanoparticles enhance in vitro gene transfer via an extracellular mechanism. *J. Control. Release*, 146(1), 118-127. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.04.031

Suzuki, M., Takayanagi, A., & Shimizu, N. (2004). Targeted gene delivery using humanized single-chain antibody with negatively charged oligopeptide tail. *Cancer Sci.*, 95(5), 424-429. doi: 10.1111/j.1349-7006.2004.tb03226.x

Taratula, O., Garbuzenko, O. B., Kirkpatrick, P., Pandya, I., Savla, R., Pozharov, V. P., . . . Minko, T. (2009). Surface-engineered targeted PPI dendrimer for efficient intracellular and intratumoral siRNA delivery. *J. Control. Release*, 140(3), 284-293. doi: 10.1016/j.jconrel.2009.06.019

*** Developed a multifunctional nanocarrier with well decoupled features and used in vivo platform to evaluate their efficiency.**

- Tseng, Y.-C., Mozumdar, S., & Huang, L. (2009). Lipid-based systemic delivery of siRNA. [review]. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 61(9), 721-731. doi: 10.1016/j.addr.2009.03.003
- Wang, M., & Thanou, M. (2010). Targeting nanoparticles to cancer. [review]. *Pharm. Res.*, 62(2), 90-99. doi: 10.1016/j.phrs.2010.03.005
- Wijagkanalan, W., Kawakami, S., & Hashida, M. (2011). Glycosylated carriers for cell-selective and nuclear delivery of nucleic acids. [review]. *Front. Biosci.*, 16, 2970-2987. doi: 10.2741/3892
- Xue, H. Y., & Wong, H. L. (2011). Solid lipid-PEI hybrid nanocarrier: an integrated approach to provide extended, targeted, and safer siRNA therapy of prostate cancer in an all-in-one manner. *ACS Nano*, 5(9), 7034-7047. doi: 10.1021/nn201659z
- Yamada, Y., Hashida, M., Hayashi, Y., Tabata, M., Hyodo, M., Ara, M. N., . . . Harashima, H. (2013). An approach to transgene expression in liver endothelial cells using a liposome-based gene vector coated with hyaluronic acid. *J. Pharm. Sci.*, 102(9), 3119-3127. doi: 10.1002/jps.23480
- Yoshihara, C., Shew, C. Y., Ito, T., & Koyama, Y. (2010). Loosening of DNA/polycation complexes by synthetic polyampholyte to improve the transcription efficiency: effect of charge balance in the polyampholyte. *Biophys. J.*, 98(7), 1257-1266. doi: 10.1016/j.bpj.2009.11.047
- Zhang, X., Pan, S. R., Hu, H. M., Wu, G. F., Feng, M., Zhang, W., & Luo, X. (2008). Poly(ethylene glycol)-block-polyethylenimine copolymers as carriers for gene delivery: effects of PEG molecular weight and PEGylation degree. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 84(3), 795-804. doi: 10.1002/jbm.a.31343

2.8 Le dextrane et ses dérivés

2.8.1 Le dextrane : biomatériau pionnier

Le dextrane est un biopolymère utilisé dans le domaine de la santé depuis la première moitié du XX^e siècle. Les premières investigations cliniques sur ce polymère datent des années 1940 (Thorsen, 1949). Ses principales applications sont l'expansion volémique en cas d'hypovolémie et en urgence, la vectorisation de fer pour des cas d'insuffisance en fer¹⁷.

Ce polysaccharide est un glucane quasi-linéaire. Sa structure consiste en une chaîne principale formée de glucoses liés par un lien osidique α -1,6. Environ 5% des unités d'anhydroglucose (AGU) présentent un branchement en α -1,3, comportant un à deux AGU, voir **Schéma 2-9**. Le dextrane de notre fournisseur est produit à partir d'une souche bactérienne *Leuconostoc mesenteroides* B512F, fermentant un milieu riche en sucrose¹⁸.

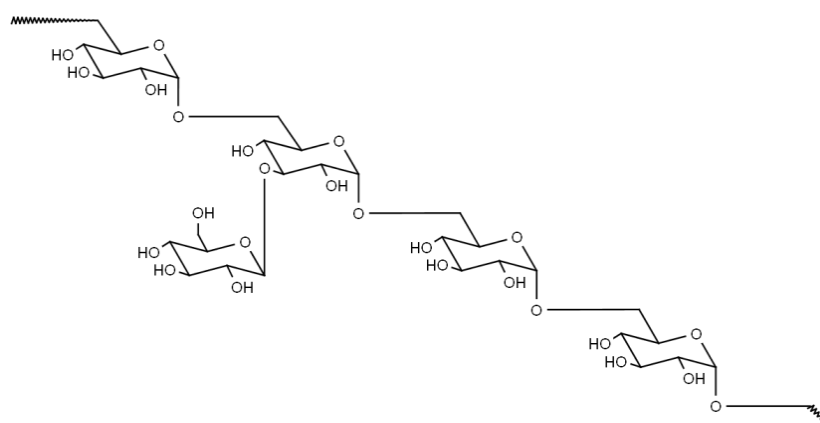


Schéma 2-9 : Fragment représentatif de chaîne de dextrane.

Le profil de résonance magnétique nucléaire pour le proton (¹H-NMR) du dextrane dans l'oxyde de deutérium (D₂O) à 70°C présente certaines caractéristiques utiles permettant de caractériser ses dérivés. Un spectre ¹H-NMR correspondant au dextrane T70 est reporté en sous-section suivante.

¹⁷ Source : FDA (www.fda.gov)

¹⁸ Source : Pharmacosmos A/S (www.dextran.net)

Une grande variété de modifications est envisageable à partir du dextrane, afin de lui conférer une réactivité spécifique ou simplement certaines fonctionnalités. (Heinze, Liebert, Heublein, & Hornig, 2006) Deux d'entre elles ont été mises en place dans notre laboratoire, et sont décrites dans les sous-sections suivantes.

2.8.2 La carboxyméthylation

Cette modification consiste à doter le dextrane d'acides carboxyliques sans briser le squelette carboné (c'est-à-dire sans ouvrir les unités anhydroglucose) selon le schéma réactionnel Schéma 2-10. Dans une première phase, le dextrane est activé par des ions OH^- à $\text{pH} > 13$ pour former des ions alcoolates nucléophiles ; et dans un second temps l'alcoolate vient attaquer l'acide bromoéthanoïque et libérer l'ion bromure par substitution nucléophile bimoléculaire.

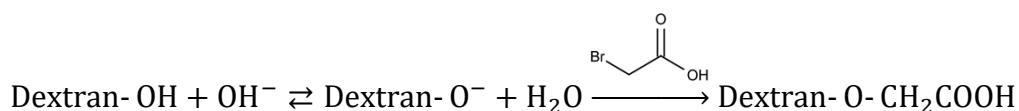


Schéma 2-10 : Mécanisme de carboxyméthylation du dextrane.

L'avancement peut être contrôlé par le pH : en l'abaissant en dessous de 5 par ajout d'acide chlorhydrique, on peut stopper la réaction faute d'ions alcoolates. Cela permet de contrôler le degré de carboxyméthylation (d_{CM}).

Cette réaction est très bien documentée ; en particulier, la proportion de carboxyméthylation sur chaque alcool d'AGU (C2, C3 et C4) vérifie le rapport 12:5:8. (Krentzel et al., 1997) Cela permet d'évaluer le d_{CM} d'une cuvée de CMD, par analyse $^1\text{H-NMR}$. En effet, lorsqu'une AGU est carboxyméthylée en C2, le déplacement chimique du proton porté par le carbone anomérique C1 passe de 5.2 à 5.35 ppm (voir Figure 2-18). En intégrant ces pics pour un échantillon de CMD donné et en appliquant le rapport $\text{C2:C3:C4} = 12:5:8$, on peut calculer le d_{CM} avec l'équation suivante :

$$d_{CM} = \frac{12 + 5 + 8}{12} \frac{a'}{a + a'}$$

Équation 2-1 : Obtention du d_{CM} à partir de l'intégration des pics d'intérêt de $^1\text{H-NMR}$.

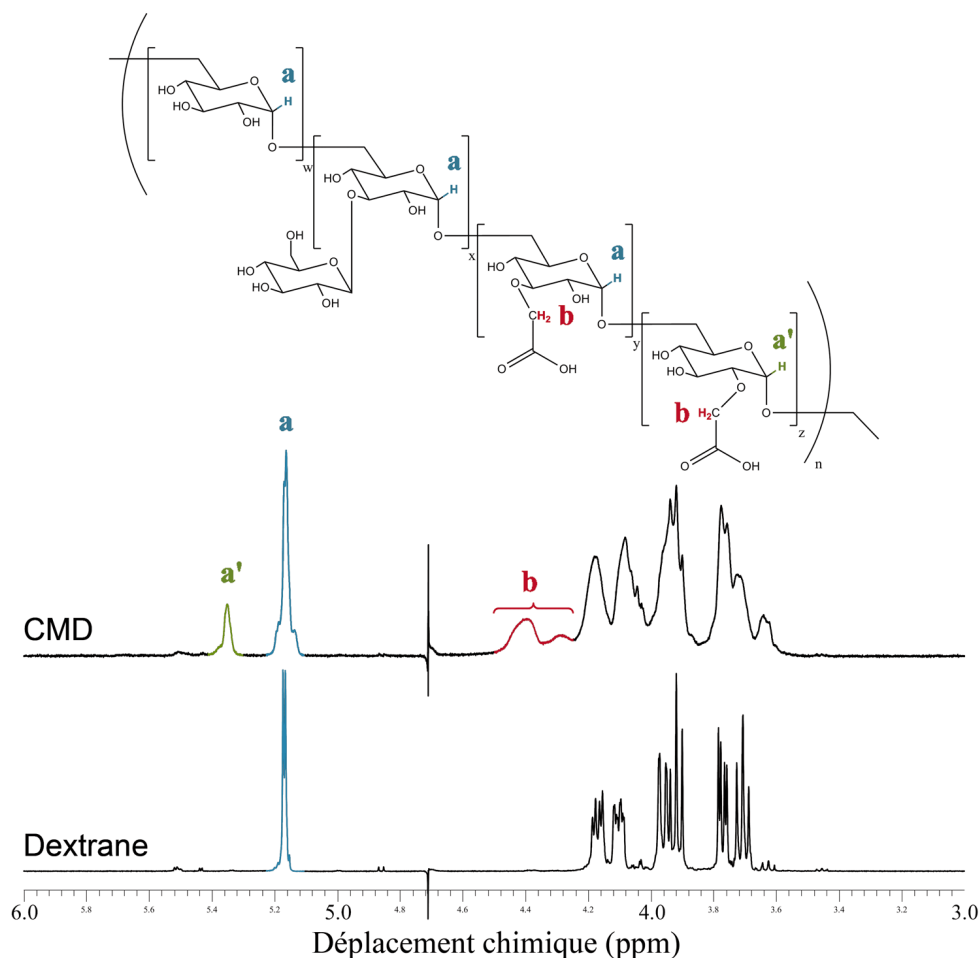


Figure 2-18 : Spectres ^1H -NMR représentatifs de dextrane et de CMD.

Nous n'utiliserons pas directement le d_{CM} pour discuter de l'impact de la carboxyméthylation dans notre étude. En effet cette réaction augmente significativement la masse molaire moléculaire du dextrane, or cette dernière est un des paramètres dont nous avons étudié l'impact. C'est pourquoi nous sommes passés par la densité de charge CD – soit le nombre de porteurs de charges négatives par unité de masse de CMD – pour décrire les CMD de notre chimiothèque. Nous exprimerons la CD en moles de porteurs de charges par kilodalton, noté \ominus/kDa . La CD peut être calculée à partir du d_{CM} avec l'équation :

$$CD = \frac{d_{CM}}{0.162d_{CM} + 0.22 \times (1 - d_{CM})} \quad \text{où : 0.22 kDa et 0.162 kDa sont les masses molaires du motif AGU carboxyméthylé ou non.}$$

Équation 2-2 : Obtention de la densité de charge à partir du degré de carboxyméthylation.

2.8.3 Dextrane-vinylsulfone

La seconde modification de dextrane qui a été mise en place à l'occasion de ce projet met en jeu le divinylsulfone (DVS), un réactif homobifonctionnel de faible longueur. La réactivité du vinylsulfone vers plusieurs groupements nucléophiles est dépendante du pH (Morpurgo, Veronese, Kachensky, & Harris, 1996; Yu & Chau, 2012), voir Schéma 2-11. Toutefois, nous n'avons pas été en mesure de trouver une quantification rigoureuse de cette réactivité dans la littérature.

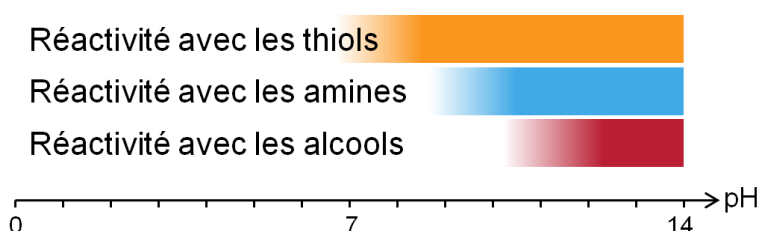


Schéma 2-11 : Aperçu qualitatif de la réactivité de la fonction vinylsulfone dans l'eau.

Nous nous sommes inspirés d'un protocole de fonctionnalisation de polysaccharides portant des hydroxyles, alors récemment publié (Yu & Chau, 2012). Dans ces travaux, les auteurs ont exploré la possibilité de contrôler le degré de modification des polysaccharides avec le DVS au moyen de plusieurs paramètres : la concentration en DVS, le temps et le pH.

La réaction entre le dextrane et le DVS suit le mécanisme d'addition de Michael suivant :

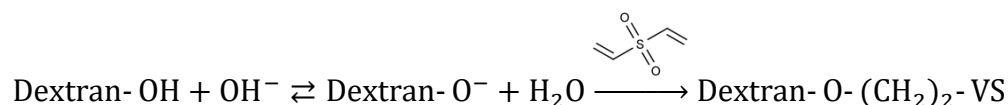


Schéma 2-12 : Mécanisme réactionnel menant au dextrane-vinylsulfone.

Tout comme pour la carboxyméthylation, la réaction est menée en conditions alcalines, et peut être stoppée en abaissant le pH suffisamment (à pH 5 ou en dessous) pour rendre la quantité d'alcoolates négligeable. Cela permet de contrôler le degré de modification (d_{VS}) du dextrane.

Une analyse $^1\text{H-NMR}$ permet également de quantifier le d_{VS} , et cela de manière plus directe de par la présence de pics spécifiques attribués à la double liaison C=C portée par le vinylsulfone, voir Figure 2-19. L'Équation 2-3 permet de calculer d_{VS} :

$$d_{VS} = \frac{1}{3} \frac{b + c + d}{a + a'}$$

Équation 2-3 : Obtention du d_{VS} à partir de l'intégration des pics d'intérêt de $^1\text{H-NMR}$.

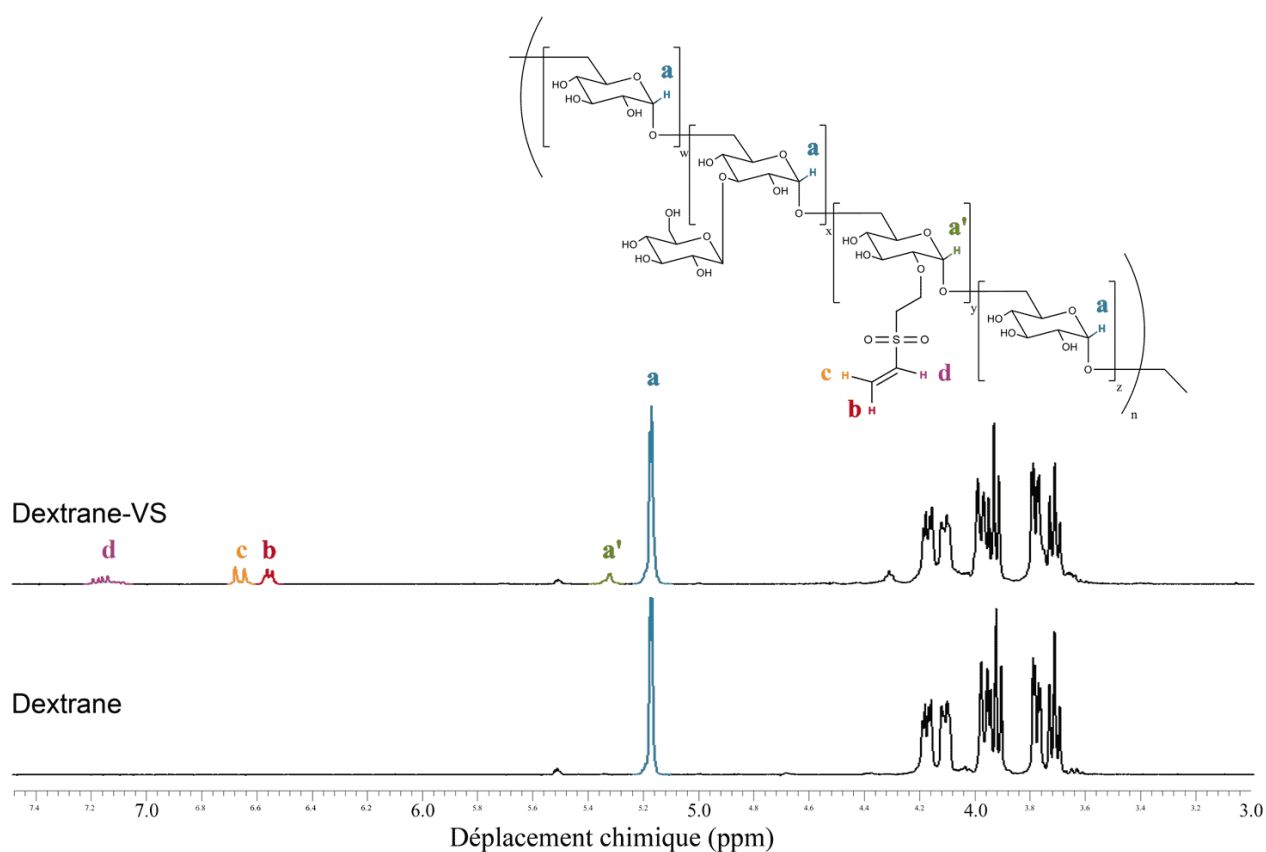


Figure 2-19 : Spectres $^1\text{H-NMR}$ représentatifs de dextrane et de Dextrane-VS.

2.9 La superhélice EK

Ce duo de peptides conçu *de novo* (Tripet et al., 1996) est inspiré d'une structure quaternaire, rencontrée naturellement dans des interactions protéine-protéine de tous les organismes, appelée superhélice ou *coiled-coil*.

Cette structure consiste en l'hétérodimérisation de deux chaînes peptidiques sous l'action d'interactions à la fois électrostatiques et hydrophobes. Dans le cas des peptides Ecoil et Kcoil, chaque chaîne isolée adopte une conformation aléatoire. Lorsque ces peptides sont mis en présence l'un de l'autre, deux hélices alpha vont se former spontanément et s'enrouler l'une autour de l'autre. La source de cette structure réside dans la configuration de chaque chaîne en heptades, des blocs de sept résidus dans lesquels chaque position (de *a* à *g*) joue un rôle spécifique dans l'interaction comme illustré Schéma 2-13. Brièvement, les résidus des positions *a* et *d* participent à la formation d'un cœur hydrophobe entre les deux peptides ; les résidus des positions *e* et *g* forment des ponts électrostatiques donnant sa spécificité à l'interaction : deux peptides identiques ne vont pas interagir de manière constructive. La conception rationnelle de ce type de peptides permet d'en régler finement les propriétés telles que la constante thermodynamique de dissociation K_D [8], ainsi que sa dépendance au pH [9].

Le tandem E/Kcoil dont il est l'objet dans ce projet a déjà été utilisé dans notre équipe en tant que système d'immobilisation orientée pour la conception d'un revêtement de biomatériau protéiné (Boucher et al., 2010), ou encore pour la détection de protéines (Liberelle et al., 2010). Pour ce faire, l'un des peptides est greffé chimiquement sur un substrat, et l'autre est fusionné avec la protéine d'intérêt.

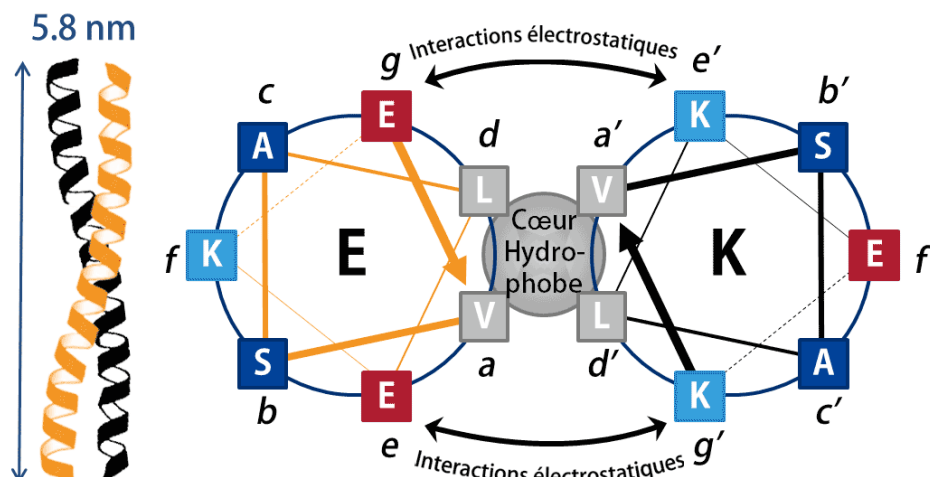


Schéma 2-13 : L'interaction superhélice ou *coiled-coil* pour le tandem peptidique E/Kcoil.
(adapté de (De Crescenzo, Litowski, Hodges, & O'Connor-McCourt, 2003))

Plusieurs avantages rendent cette méthode d'immobilisation adéquate pour de futures applications par rapport aux techniques de greffage chimique conventionnelles :

- le greffage au moyen du tandem E/Kcoil est rigide et orienté de par sa structure superenroulée, qui permet de contrôler la configuration de la protéine étiquetée sur le substrat. Cette technique offre donc une alternative aux chimies covalentes spécifiques à site unique, dont la mise en œuvre reste exigeante (Algar et al., 2011) ;
- il est possible de produire des substrats fonctionnalisés suivant un degré aisément modulable. En effet, il suffit de l'incuber avec la protéine étiquetée dans une quantité choisie pour fonctionnaliser le substrat sans relarguer aucun sous-produit de réaction. Ainsi, le dit substrat générique peut être produit à plus grande échelle, pour ensuite être modulé suivant les besoins ;
- par extension du point précédent, d'une part différentes protéines étiquetées peuvent aisément être co-immobilisées sur un même substrat générique ; d'autre part la force de la liaison non covalente due à l'hétérodimérisation peut être modulée en ne modifiant que sur le peptide partenaire présent sur la protéine.

CHAPITRE 3 DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL

La délivrance de gène à l'aide de vecteurs non viraux, et en particulier à base de polymères a été mise en contexte. Nous avons également présenté les matériaux qui sont au cœur de cette étude : le modèle de polyplexe PEI/ADN, la superhélice E/Kcoil, ainsi que le dextrane et ses dérivés. Dans la suite de cette thèse sont rapportés les résultats expérimentaux que nous avons produits, interprétés et discutés. Parmi les diverses méthodes mises en œuvre afin de découpler les propriétés des nanoparticules dans le contexte de la délivrance de gène, deux ont fait l'objet d'études approfondies.

Premièrement, nous rapportons dans le Chapitre 4 la décoration de nanoparticules par des protéines au moyen d'interactions superhélice EK, publiée dans la revue *Biomaterials* en janvier 2013. En perspective de ces résultats traitant principalement de l'influence de la densité de biomolécules décorant les polyplexes, nous avons en particulier soulevé l'importance de contrôler l'entière surface pour que la décoration de celle-ci puisse jouer le rôle souhaité. Nous avons donc par la suite creusé ce point.

Deuxièmement, une méthode d'enrobage électrostatique de nanoparticules au moyen de dextrans carboxyméthylés (CMD) a été étudiée et caractérisée pas à pas selon les propriétés de cet agent d'enrobage. Cette étude constituant le Chapitre 5 de cette thèse a fait l'objet d'un article soumis à la revue *Biomacromolecules* en février 2015. À cette occasion, l'identité physicochimique de la surface de polyplexes enrobés a été mise en relation avec le comportement de ces derniers en présence de constituants du milieu physiologique. Grâce à cette étude où une chimiothèque de CMD a pu être évaluée *in vitro* de manière systématique, nous avons pu proposer des relations structures-fonctions telles que celle reliant le potentiel zêta à la prévention de l'opsonisation et de l'aggrégation de globules rouges. Ainsi, seuls 4 de nos CMD sur 26 ont passé l'ensemble de nos tests *in vitro* de compatibilité avec le milieu physiologique.

Ensuite, le Chapitre 6 inclut deux volets ayant succédé aux deux premières études : le premier relate la conception et la préparation de conjugués dextrane-peptides pour la formation de nanoparticules multifonctionnelles. L'objectif sous-jacent était d'équiper un polyplexe du système à superhélice EK directement au cœur et non en surface de celui-ci. Nous avons ainsi

obtenu des polyplexes aux caractéristiques physiques satisfaisantes, sans toutefois obtenir de gain significatif comparé à l'emploi du PEI en délivrance de gènes, et ce malgré l'implémentation d'une nouvelle stratégie d'échappement endosomal basée sur l'emploi du peptide endosomolytique GALA étiqueté du peptide Ecoil.

Le second volet du Chapitre 6 traite de la formulation de nanoparticules lyophilisées pour l'injection dans des animaux à des fins d'immunisation par ADN. Ici nous avons capitalisé sur les résultats encourageants issus de notre étude *in vitro* systématique de la chimiothèque de CMD. Après la mise au point d'un procédé de lyophilisation et de concentration de polyplexes enrobés, deux essais *in vivo* ont été menés sur des souris saines afin de doser l'expression de gènes rapporteurs dans le plasma. Malgré une expression de gène rapporteur indétectable, ces tests étayaient le pouvoir prédictif de nos tests *in vitro* sur les performances *in vivo* de polyplexes.

Un dernier volet rapporté en annexe traite de l'influence de l'ajout de polyanion après transfection dans le cadre de l'expression transitoire de gènes à des fins de production de protéines recombinantes (r-protéines). Trois paramètres – le type de polyanion, sa dose, et le délai de son ajout après transfection – ont été explorés, sans mettre en évidence de gain significatif en rendement de r-protéine.

Suite à une discussion générale formant le 0, des recommandations sont proposées avec des remarques conclusives.

•

CHAPITRE 4 ARTICLE 2 : IMMOBILISATION ORIENTÉE DE LIGAND PAR SUPERHÉLICE SUR DES NANOPARTICULES POUR LA DÉLIVRANCE CIBLÉE DE GÈNE

Truth will sooner come out from error than from confusion

Sir Francis Bacon, 1620 (aphorisme 20, *Novum Organum*, Livre II)

4.1 Présentation de l'article

Dans cette section est repris l'article intitulé *A versatile coiled-coil tethering system for the oriented display of ligands on nanocarriers for targeted gene delivery*, qui a été publié dans le journal *Biomaterials* (Vol. 34, No. 4, p. 1344-1353) en janvier 2013.

Modifier la surface de nanocapsules non virales pour la livraison de gène pourrait les rendre plus performantes. Cela permettrait par exemple de les cibler vers un récepteur cellulaire, de leur permettre de s'échapper des endosomes ou de faciliter leur transport jusque dans le noyau. Dans ce contexte, nous rapportons ici la conception d'un protocole d'immobilisation de biomolécules ajustable et polyvalent pour fonctionnaliser des nanocapsules. Notre stratégie est basée sur l'interaction superhélice spécifique entre un ligand étiqueté d'un peptide et une nanocapsule fonctionnalisée avec le peptide complémentaire. Nous rapportons comme preuve de concept le ciblage de polyplexes ADN/polyéthylènimine (PEI) vers le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) de cellules A431. L'immobilisation orientée par superhélice du facteur de croissance épidermique (EGF) a fortement augmenté le taux d'internalisation des polyplexes ainsi ciblés. Ensuite, nous avons finement ajusté la densité de surface du ligand de ciblage, ce qui a mis en évidence un effet de pallier reliant le taux d'internalisation au rapport ligands / polyplexes. Ces travaux préfigurent des applications potentielles de cette technologie afin de remédier aux difficultés de production de protéines recombinantes liées à l'expression transitoire de gène.

4.2 A versatile coiled-coil tethering system for the oriented display of ligands on nanocarriers for targeted gene delivery

Charles Fortier^{a,b}, Gregory De Crescenzo^{a,}, Yves Durocher^{b,*}*

^a Department of Chemical Engineering, Groupe de Recherche en Sciences et Technologie Biomédicales (GRSTB), Bio-P² Research Unit, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montreal (QC), Canada H3C 3A7.

^b Life Sciences | NRC Human Health Therapeutics Portfolio, Building Montreal-Royalmount, National Research Council Canada, Montreal (QC), Canada H4P 2R2.

* Correspondence should be addressed either to yves.durocher@cnrc-nrc.gc.ca or gregory.decrescenzo@polymtl.ca.

4.2.1 Abstract

Surface modification of non-viral gene delivery nanocarriers may provide advanced features such as receptor targeting, endosomal escape and nuclear import. We here report the design of a versatile and tunable immobilization protocol to functionalize nanocarriers for improved transient gene expression. Our strategy is based on specific interactions occurring between a coil-tagged ligand and a complementary coil-functionalized nanocarrier. As a proof of concept, targeting of DNA/polyethylenimine polyplexes to the epidermal growth factor receptor of A431 cells was investigated. Coiled-coil-mediated oriented tethering of epidermal growth factor triggered a drastic increase of the internalization rate of the targeted polyplexes. To explore the tunability of our platform, surface density of targeting ligand was varied; our results indicated that the internalization rate varied with the ligand-to-polyplex ratio in a “switch mode” fashion. This work prefigures possible avenues for our coiled-coil platform in multiplex functionalization to address transient gene expression bottlenecks in recombinant protein production.

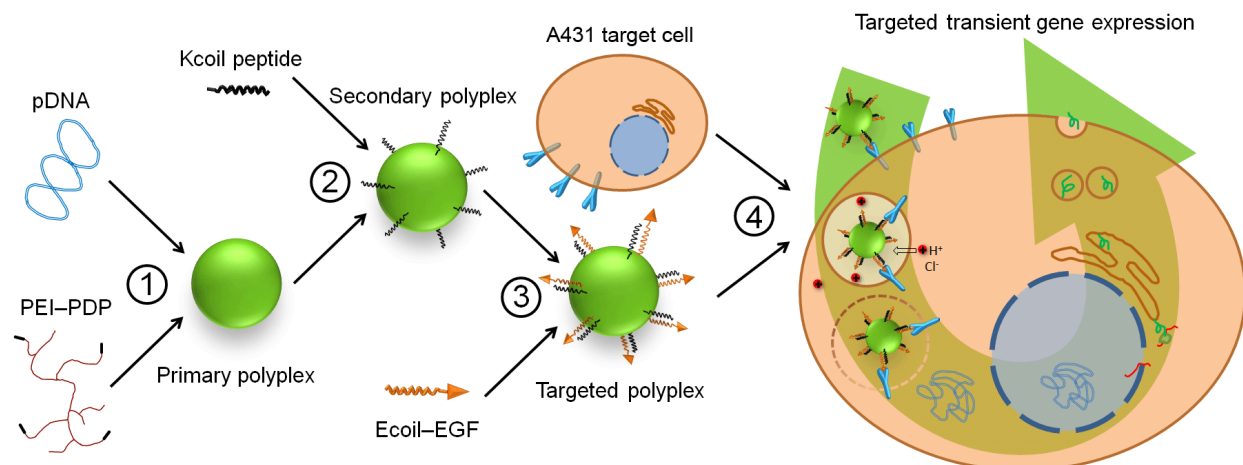


Figure 4-1: Graphical abstract.

4.2.2 Keywords

Transfection, Non-viral vector, nanocarrier, Coiled-coil, Targeting, Oriented tethering, Epidermal growth factor (EGF)

4.2.3 Introduction

Transient gene expression (TGE) is a recently established method for the production of recombinant proteins (r-proteins) for research and development purposes, at quantities ranging from milligrams up to grams of r-proteins. Over the years, much interest has been given to increase the volumetric yield of r-protein production and to eventually apply this technology for the production of clinical grade biologics (Backliwal et al., 2008; Geisse, 2009; Pham, Kamen, & Durocher, 2006). In that respect, various aspects of non-viral gene delivery protocols in bioreactors have been enhanced, including culture media, plasmid design, cell lines and transfection agents. That ongoing optimization has been concomitant with a better, yet far from complete, understanding of the main steps engaged in non-viral gene delivery. So far, one of the major bottlenecks that have been identified in TGE is intracellular trafficking and nuclear import of plasmid DNA (Carpentier, Paris, Kamen, & Durocher, 2007; Drake & Pack, 2008). In the meantime, a great deal of effort has been dedicated to implement gene delivery to gene therapy, a major target of which being cancer. Owing to a radically different paradigm, desired features of

nanocarriers to be used in this endeavour include stealth, stability in serum, and cell surface receptor or antigen targeting (Itaka & Kataoka, 2009; Midoux, Breuzard, Gomez, & Pichon, 2008; Mintzer & Simanek, 2009). In that context, the purpose of receptor targeting ability is to provide vectors with specificity towards diseased tissue, so that off-target transfection in healthy tissues may be abrogated or at least limited.

To our knowledge, receptor targeting has not yet been implemented for large-scale r-protein production purposes. Although there is no need for cell specificity features in the context of r-protein production since single cell cultures are used in most biotechnology processes, receptor-targeted gene delivery vectors may provide interesting avenues to enhance DNA endocytosis and nuclear import through receptor-mediated mechanisms, and thus address the major bottlenecks of TGE when used for r-protein production. With that in mind, we here report the design of a versatile non-viral vector allowing for cell-surface receptor targeting by means of ligand decoration. Our strategy is based on specific interactions occurring between a coil-tagged ligand and its complementary coil-functionalized vector (Figure 4-2).

In this study, in order to focus on the feasibility of our biomolecule tethering strategy, we used polyethylenimine (PEI), as DNA-condensing agent. Branched 25-kDa PEI (bPEI) was chosen over its linear form for two reasons: it has already demonstrated excellent transfection capabilities (Durocher et al., 2002; Itaka & Kataoka, 2009; Lungwitz, Breunig, Blunk, & Gopferich, 2005; Midoux et al., 2008; Mintzer & Simanek, 2009; Tiera, Shi, Winnik, & Fernandes, 2011), and it has numerous primary amino groups, enabling its functionalization. The latter was achieved through the use of a heterobifunctional molecule to link primary amino groups of bPEI to a thiol-bearing peptide (Carlsson, Drevin, & Axen, 1978) belonging to a *de novo* designed coiled-coil heterodimerizing system (Figure 4-2). The Kcoil/Ecoil heterodimer we chose was originally designed by Tripet and colleagues (Tripet et al., 1996) and then further extensively characterized (De Crescenzo, Litowski, et al., 2003). The use of these peptides has already been reported for various biotechnological and biomedical applications, including the stable capture of proteins on various surfaces (Boucher et al., 2010; Liberelle et al., 2010; Pechar & Pola, 2012). These peptides are characterized by strong, specific and oriented interactions with each other in a broad range of aqueous solutions, including physiological conditions and distilled water, which make them ideal for gene delivery vector targeting applications (Algar et al., 2011). In order to evaluate the potential of this molecular assembly system in the design of surface-

enhanced vectors, we here report the grafting of one coil peptide (*i.e.* the Kcoil) onto PEI-based nano-carrier for the subsequent recruitment of ligand (*e.g.* epidermal growth factor) tagged with the complementary Ecoil. The tunability of our strategy was further investigated by studying the impact of both N:P ratio and Kcoil density on our nano-carriers upon their attachment and uptake rate in an *in vitro* cell assay.

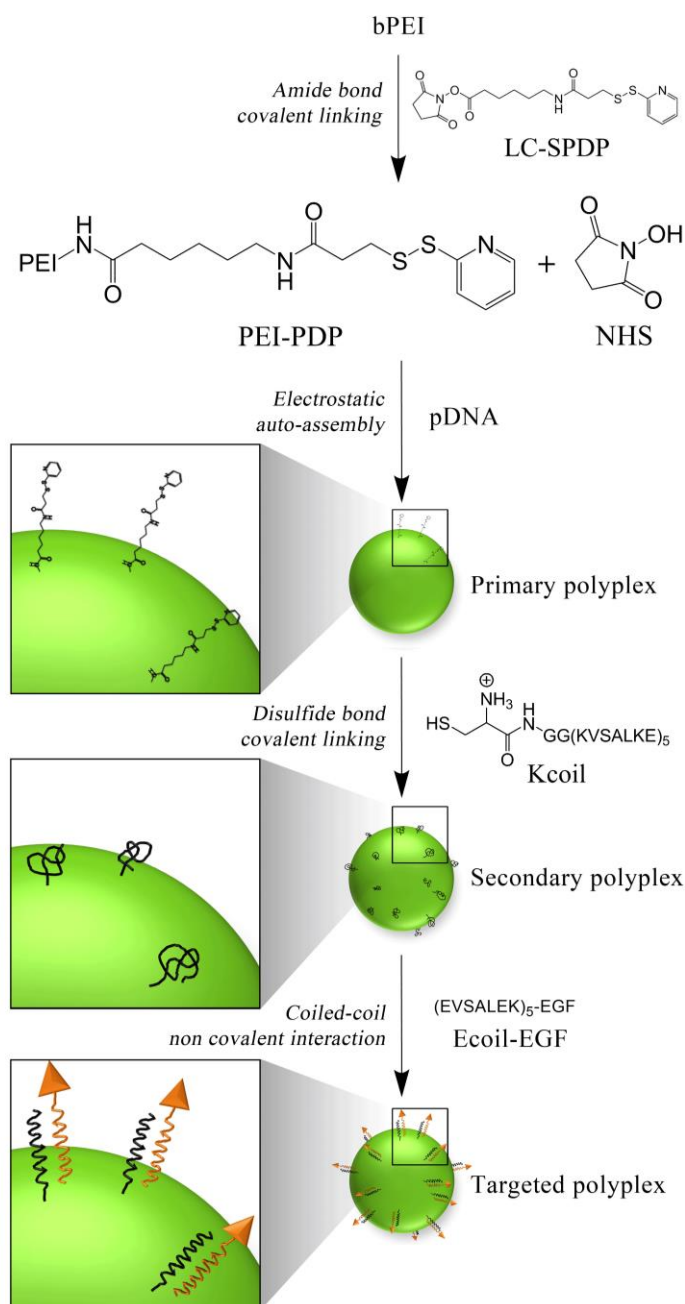


Figure 4-2: Schematic representation of coiled-coil mediated ligand immobilization strategy on nanocarriers.

4.2.4 Materials and Methods

4.2.4.1 Chemical reagents and biomolecules

Branched PEI 25 kDa (99+ % purity), Orange II sodium salt (92 % purity), 2-pyridinethiol (99 % purity), ethidium bromide (95 % purity), tyrphostin AG 1478 (99+ % purity) and cysteine (99+ % purity) were purchased from Sigma-Aldrich Canada, Ltd. (Oakville, ON). Succinimidyl 6-[3-(2-pyridyldithio)-propionamido]hexanoate (LC-SPDP, 95+% purity) was obtained from Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL). Trypan blue stain (0.4 % in 0.85 % saline) and YOYO-1 iodide (1 mM solution in DMSO) were purchased from Invitrogen Corp. (Burlington, ON). Accutase (in Dulbecco's PBS containing 0.5 mM EDTA) was obtained from Innovative Cell Technologies, Inc. (San Diego, CA). Cysteine-tagged Kcoil peptides were synthesized by the peptide facility at University of Colorado (Denver, CO). Ecoil-tagged EGF (Ecoil-EGF) and mRFP (Ecoil-mRFP) were produced in 293-6E cells and purified by immobilized metal-ion chromatography as previously described (Boucher et al., 2008). The purified proteins were then desalted, quantified by absorbance determination at 280 nm on a Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific), analyzed by SDS-PAGE and finally sterile-filtered, aliquoted and stored at -80°C until use.

4.2.4.2 Preparation and characterization of PEI-PDP

For LC-SPDP conjugation to bPEI, 175 µL of 20 mM LC-SPDP in ethanol were added to 1.575 mL of 63.5 mM bPEI (monomer concentration) in PBS buffer (pH 7.4). The reaction was carried out at room temperature in the dark under constant agitation for 2 hours. LC-SPDP-activated bPEI (PEI-PDP) was then purified from reaction by-products by size exclusion chromatography using a HiPrep 26/10 column loaded with Sephadex G-25 fine (GE Healthcare Life Sciences, Inc.) and mounted on an ÄKTA Explorer station (Amersham Biosciences, Ltd.). The reaction mix (1.75 mL) was eluted with PBS. Purification was monitored by absorbance at 275 nm to identify the PEI-PDP elution peak. The pooled purified conjugate was then quantified: the degree of LC-SPDP substitution of bPEI primary amino groups was determined by 2-pyridinethiol release upon addition of an excess of cysteine by measuring the absorption at 343 nm against a standard curve of 2-pyridinethiol. Polymer concentration was determined by Orange II dye colorimetric assay against protonated amines of bPEI (Drogoz et al., 2007). PEI-PDP

stock solution (17.4 mM, monomeric concentration, 19.8 orthopyridyl disulfide (OPSS) moieties per 25 kDa bPEI molecule) was then aliquoted and stored at -20°C until use.

4.2.4.3 Preparation of polyplexes

Three volumes of PEI–PDP were first added to 3 volumes of DNA at an N:P ratio of 3:1 or 5.5:1 respectively, immediately vortexed and incubated for 10 minutes. Two volumes of Kcoil peptide were added to the suspension and the conjugation reaction was carried out for 23 hours or 4.5 hours respectively at room temperature in the dark. Kcoil grafting was followed by absorbance of 2-pyridinethiol release. Then, one volume of 300-fold excess cysteine was added to stop the conjugation and neutralize remaining OPSS moieties. Thirty minutes later, 3 volumes of Ecoil–EGF were added in the mixture 2 minutes prior to transfection to give a polyplex suspension at a DNA concentration of 10 µg/mL and an Ecoil:Kcoil molar ratio of 1:1. All solutions were prepared in Milli-Q water.

The evaluation of Kcoil peptide conjugation kinetics to available OPSS moieties on DNA/PEI–PDP complexes was performed on MOS-450/AF-CD spectrometer (Bio-Logic, Claix, France). Release of 2-pyridinethiol was monitored at 343 nm.

Positive control polyplexes at an N:P ratio of 11.5:1 were formed by adding 1 volume of pristine bPEI solution to 1 volume of 20 µg/mL DNA solution, followed by immediate vortexing and 10 min of incubation at room temperature. This N:P ratio was found to be the optimal formulation for the A431 cell line transfection with bPEI (data not shown).

4.2.4.4 Physical characterization of polyplexes

Plasmid DNA condensation was monitored by agarose gel electrophoresis. To this end, 20 µL of polyplex suspensions prepared as described above were loaded on a 1 % agarose gel in Tris-acetate EDTA buffer and subjected to electrophoresis at 120 V for 40 min. DNA migration was visualized by ethidium bromide staining under UV illumination on a Kodak Digital Science Station 440cf (Eastman Kodak, New York, NY).

Quantification of unbound PEI–PDP after a 10-min complexation with DNA was performed from supernatant collected after 30 min of 20,000×g centrifugation of polyplex suspensions by the Orange II dye method (Drogoz et al., 2007).

Hydrodynamic diameter and zeta potential measurements were carried out on a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Ltd.) in automatic mode using Zetasizer software, with at least 10 and 12 runs for size and zeta potential measurements respectively. All measurements were made at 25°C. Hydrodynamic diameter and zeta potential were extracted from collected photons data with the CONTIN and the Smoluchowsky's methods respectively.

4.2.4.5 Cell culture

A431 cells were maintained in DMEM (Invitrogen Corp., Burlington, ON) supplemented with 10% fetal calf serum (HyClone Cosmic, Thermo Scientific, Ltd.). Cultures were kept at 37°C in a humidified, 5%-enriched CO₂ and water-jacketed incubator. A given culture was maintained for no more than 15 passages until another A431 cells aliquot was thawed.

4.2.4.6 Transfection

Cells were distributed 18 hours prior to transfection in 12 or 24-well plates (0.5 mL or 1 mL per well respectively) at 80,000 cells per mL to let them settle on culture plate surface. One hour prior to transfection, culture medium was removed and replaced by fresh serum-free DMEM. Cells were transfected with 1 µg/mL of plasmid DNA in culture medium. Blue fluorescent protein (BFP) expressed from a pTT vector was used as a reporter gene (Durocher et al., 2002).

4.2.4.7 Polyplex uptake by flow cytometry

Cells were prepared as described above. Plasmid DNA stained with YOYO-1 dye according to the manufacturer's instructions was used to transfect A431 cells. Five, 10, 20 or 30 minutes precisely after the addition of the polyplex suspension to each well, ongoing uptake events were stopped by carefully replacing transfection medium by ice-cold PBS. Each well was further rinsed twice with ice-cold PBS and cells were detached with Accutase for flow cytometry measurement. Plasmid DNA uptake was assessed by flow cytometry on an LSR II instrument (Becton-Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ). Ten thousand events were gated to count YOYO-1-positive cells on FACSDiva software. The sample was then mixed with an equal volume of Trypan blue stain 0.4 % solution to quench extracellular YOYO-1/DNA fluorescence and then immediately analyzed for a second time on a similar basis.

4.2.4.8 Transient gene expression

Cells were prepared as described above. For polyplex rescue experiments, cells were incubated with 2.6 $\mu\text{g/mL}$ of free bPEI 4 h post transfection. One day post transfection, culture medium was removed and replaced by 10 % FCS-supplemented DMEM. Gene expression quantification was assessed by flow cytometry analysis 2 days post transfection. Ten thousand cells were gated to count BFP-positive cells.

4.2.4.9 Confocal microscopy

Cells were prepared as described above in 35-mm glass bottom dishes (MatTek Corp., Ashland, MA) (2 mL at 80,000 cells per mL). Plasmid DNA stained with YOYO-1 dye according to the manufacturer's instructions was used for transfection. For each formulation, images were captured at 10 min post transfection on a FV10i-DOC confocal microscope (Olympus Corp., Tokyo, Japan) equipped with a INUBG2E-FV10i 5%-enriched CO_2 water-jacketed incubator stage (Tokai Hit CO., Ltd., Fujinomiya, Japan) with a 1.35 NA 60 \times oil-immersed objective.

4.2.4.10 Statistical analysis

Values are displayed as mean value \pm standard deviation. Statistical analysis was carried out by independent two-sample t-test with equal variances. Values of $p < 0.05$ and $p < 0.001$ were considered to be statistically significant and are referred to by * and **, respectively.

4.2.5 Results

4.2.5.1 Formation of DNA/PEI–PDP primary polyplexes

Conjugate resulting from the activation of bPEI with LC–SPDP (named hereafter as PEI–PDP) was prepared as described in the Material and Methods section, leading to 19.8 orthopyridyl disulfide (OPSS) moieties per 25 kDa bPEI molecule. The ability of PEI–PDP to bind and condense DNA was first compared to that of pristine bPEI. Electrophoretic pattern of DNA being condensed with our conjugate and with pristine bPEI were compared in an agarose gel retardation assay. Representative patterns are reported in Figure 4-3(a); their high degree of similarity strongly suggested that the additional 19.8 OPSS moieties grafted on 25-kDa branched

PEI did not alter its binding affinity for DNA. In order to gain insight into the stoichiometry of PEI–PDP binding to plasmid DNA, quantification of unbound PEI–PDP upon addition of DNA to an increasing amount of PEI–PDP was performed by the Orange II dye colorimetric assay (Drogoz et al., 2007). As can be seen in Figure 4-3(b), the minimum amount of PEI–PDP necessary for complete DNA condensation in pure water corresponded to an N:P ratio slightly below 3:1, in good agreement with what had repeatedly been reported for branched PEI (Boeckle et al., 2004; Yue et al., 2010). N:P ratios equal to 3:1 were thus originally selected to perform subsequent Kcoil peptide conjugation onto DNA/PEI–PDP primary complexes as a balance between two aspects: first, it corresponded to an amount of PEI–PDP being slightly higher than that needed for exact stoichiometry, thus ensuring robustness and reproducibility by avoiding particle surface charge neutrality and, in turn, particle aggregation. Second, the proportion of unbound PEI–PDP chains was kept reasonably low to ensure that most of subsequently added Kcoil would be mainly conjugated to DNA-complexed PEI–PDP.

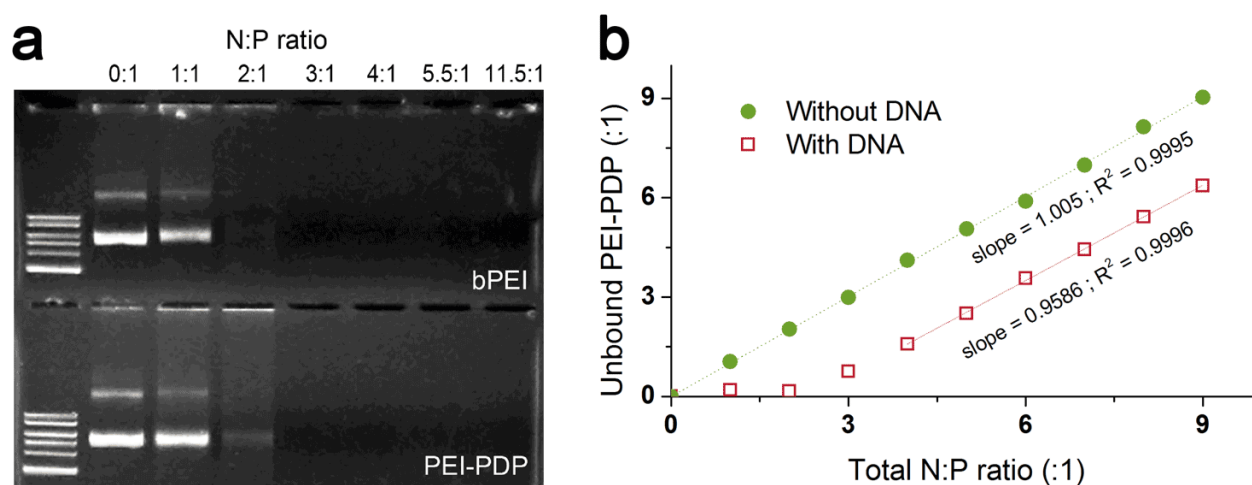


Figure 4-3: Complexation behavior between PEI–PDP and plasmid DNA. Representative electrophoretic patterns of pristine bPEI (top) and PEI–PDP (bottom) (a); Quantification of unbound PEI–PDP in supernatants of centrifuged complex suspensions in the presence (empty squares) or in the absence (filled circles) of plasmid DNA.

4.2.5.2 Uptake response to DNA/PEI-Kcoil secondary polyplexes with different ligand densities

Conjugation of Kcoil peptides to already formed DNA/PEI-PDP complexes was first monitored by following the release of 2-pyridinethiol by-product (Figure 4-2) by absorbance. Secondary polyplex physical stability was also assessed during conjugation by both hydrodynamic diameter and zeta potential monitoring by means of dynamic light scattering. Representative results are summarized in Figure 4-4. In order to form polyplexes with a wide range of ligand densities, the amount of Kcoil peptide added to the DNA/PEI-PDP complex suspension was varied. An equal amount of Ecoil-EGF was then added to the DNA/PEI-Kcoil suspension for coiled-coil mediated decoration with Ecoil-EGF, so that the overall Kcoil:Ecoil ratio was kept at 1:1. The resulting attachment and internalization of targeted polyplexes at an N:P ratio of 3:1, at 10 min post addition, is reported in Figure 4-5(a) as a function of the concentration of Ecoil-EGF that had been added. Note that here, the term *Attachment* refers to the total YOYO-1/DNA cell fluorescence that was measured, which corresponded to the ability of polyplexes to bind to the cell membrane within 10 min. The term *Internalization* refers to intracellular fluorescence, which corresponded to polyplex uptake. Both readings were made on the same samples before and after extracellular fluorescence quenching, respectively. Polyplexes corresponding to positive controls (pristine bPEI/DNA mixtures at 11.5:1 ratio) were observed to strongly bind to cells, but were not significantly internalized within 10 minutes (less than 2% positive cells, Figure 4-5(a)). Conversely, secondary polyplexes corresponding to Ecoil-EGF concentrations ranging from 0.14 to 17 nM showed a mitigated binding ability that was reflected on their internalization ability (Figure 4-5(a)). Still, an increasing trend for internalization could be observed from a threshold targeting Ecoil-EGF concentration of *ca.* 3 nM in culture medium. Although significantly higher than the uptake of pristine bPEI positive control, the uptake of targeted polyplexes remained modest within the first 10 minutes as about 25% of cells internalized labeled DNA when Ecoil-EGF concentration was fixed at 17 nM.

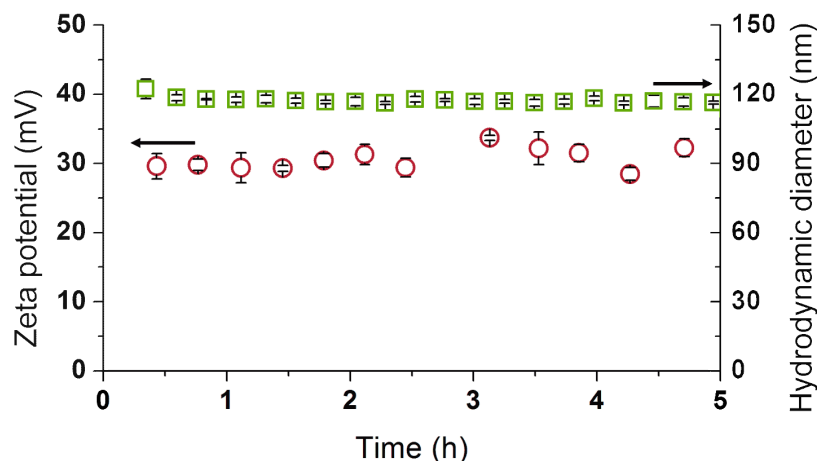


Figure 4-4: Biophysical characteristics of DNA/PEI-PDP complex suspension monitored over time with an N:P ratio of 5.5:1. Zeta potential (empty circles) and hydrodynamic diameter (empty squares) were monitored for 5 hours using dynamic light scattering.

We correlated this mitigated behavior of our decorated 3:1 ratio polyplexes to their physical characteristics. Indeed, as shown in Figure 4-5(c), although sufficient for DNA encapsulation, an N:P ratio of 3:1 resulted in the formation of polyplexes that were morphologically different from those resulting from the standard N:P ratio of 11.5:1. Indeed, N:P 3:1 polyplexes outgrew N:P 11.5:1 ones by 40 % in size, but displayed a surface charge by 45 % weaker. Interestingly, we determined that, for an intermediate N:P ratio of 5.5:1, DNA/PEI-PDP complexes displayed a zeta potential close to that displayed by N:P 11.5:1 positive control polyplexes (Figure 4-5(c)). Therefore, to match zeta potential, an N:P ratio of 5.5:1 was used in subsequent experiments, although it implied that about half of total PEI-PDP would be free in solution.

The polyplex binding and uptake experiments were then conducted at this ratio, corresponding results are shown in Figure 4-5(b). In stark contrast with previous results related to N:P 3:1 targeted polyplexes (Figure 4-5(a)), the N:P 5.5:1's showed a strong binding to cell membrane, comparable to that of positive control, regardless of the targeting ligand concentration. For targeted polyplex uptake, a threshold targeting ligand concentration of *ca.* 1 nM was observed; and uptake values as high as 75% were observed for concentrations of Ecoil-EGF equal to 17 nM (Figure 4-5(b)).

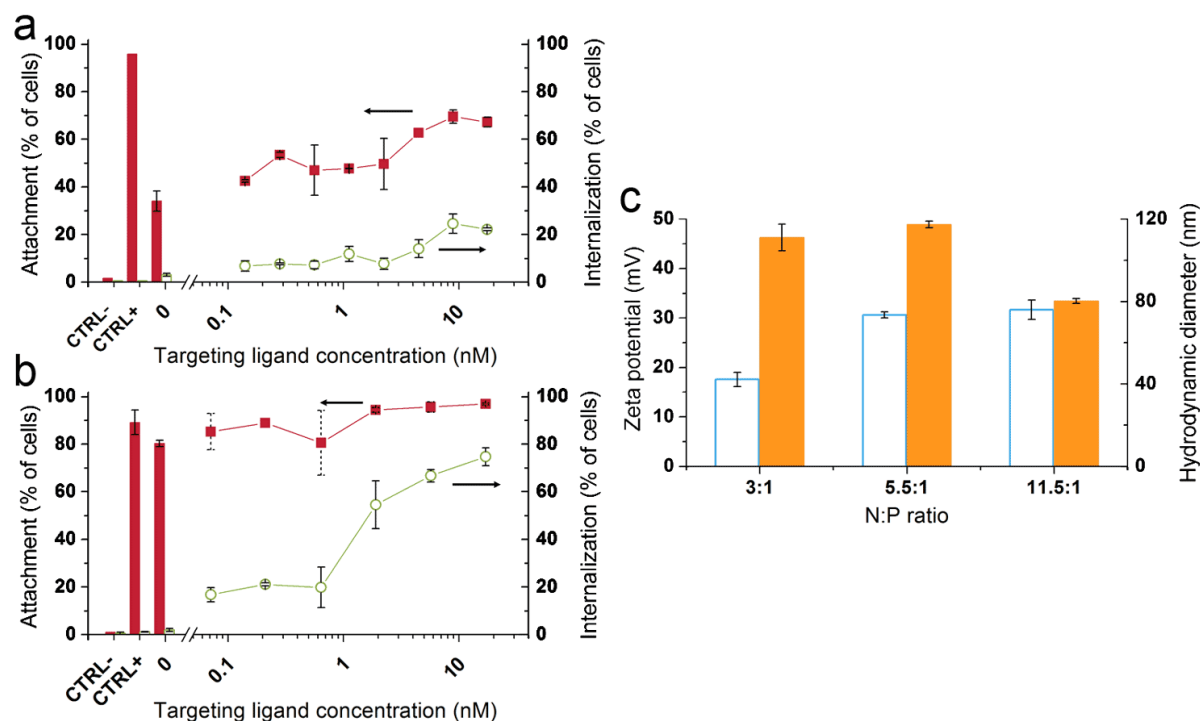


Figure 4-5: Synergistic effect of both receptor targeting and high positive surface charge on polyplex uptake. Total complex attachment (filled squares) and internalization (empty circles) of polyplexes by A431 cells for targeted complexes formed at an N:P ratio of 3:1 (a), or 5.5:1 (b). The corresponding YOYO-1/DNA fluorescence associated with polyplexes was measured by flow cytometry on samples constantly kept on ice from 10 min precisely after polyplex addition to cells. Negative control corresponds to plasmid DNA alone and positive control corresponds to DNA/bPEI complexes formed at an N:P ratio of 11.5:1. (c) Zeta potential (empty columns, left) and hydrodynamic diameter (filled columns, right) of polyplexes formed at the N:P ratios used in our experiments. N:P ratios of 3:1 and 5.5:1 correspond to DNA/PEI–PDP complexes, and the N:P ratio of 11.5:1 corresponds to a bPEI/DNA complex, otherwise referred to as the positive control.

4.2.5.3 Uptake kinetics

As can be seen in Figure 4-6(a), positive control polyplexes made of pristine bPEI at an N:P ratio of 11.5:1 interacted very fast with A431 cell membrane, as nearly 100 % of cells displayed characteristic fluorescence 5 min post transfection. In contrast, our ligand-targeted polyplex interaction with A431 cells was significantly slower since only 70% of cells displayed surface-bound polyplexes 5 min post transfection, while 100 % positive cell counts were observed close to 20 min post transfection.

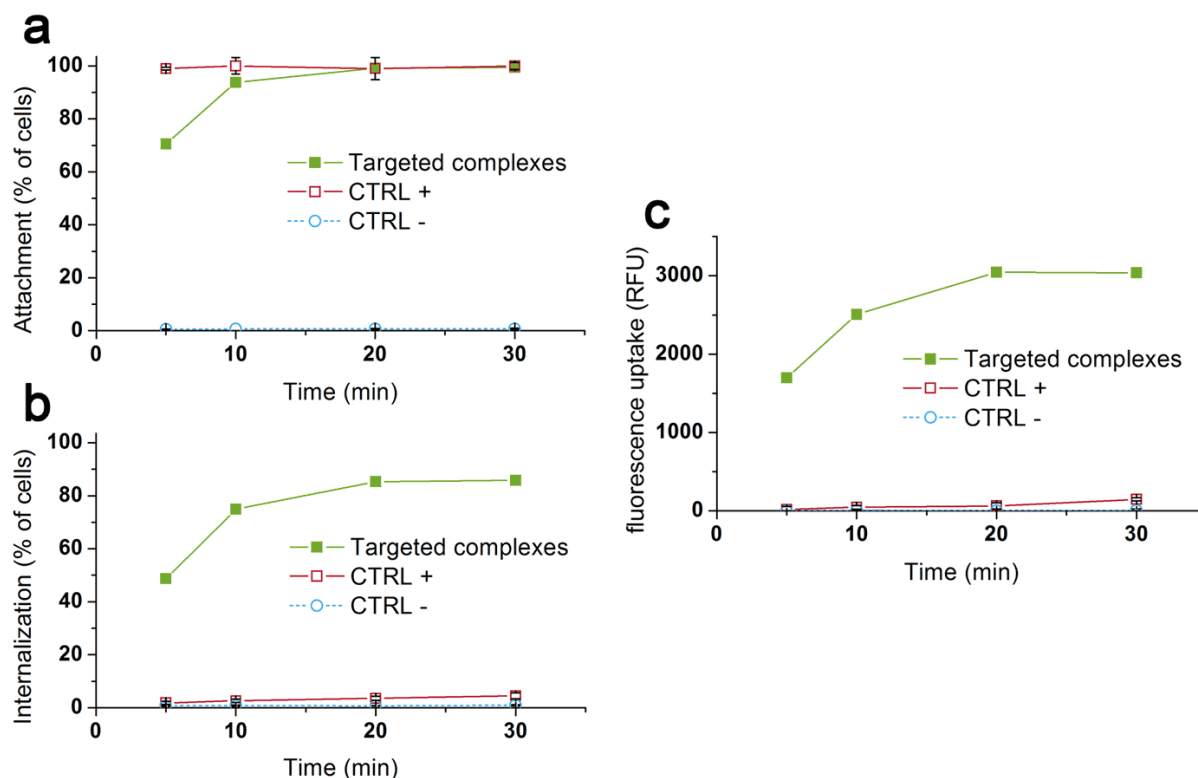


Figure 4-6: Uptake kinetics of targeted polyplexes (empty squares) compared with that of positive control (filled squares) and negative control (empty circles). Targeted polyplexes were formed at an N:P ratio of 5.5:1 and a targeting ligand concentration of 17 nM in culture medium. Proportion of cells with polyplexes attached on the membrane (a); proportion of cells that internalised polyplexes (b); mean YOYO-1/DNA-associated fluorescence intensity of cells (c). The corresponding YOYO-1/DNA fluorescence associated with polyplexes was measured by flow cytometry on samples constantly kept on ice from 5, 10, 20 or 30 min precisely after polyplex addition to cells.

In spite of this decreased performance in terms of attachment, binding of targeted polyplexes was followed by a rapid internalization (within 30 min, Figure 4-6(b), see also Figure 4-8 first three columns), as 85 % of the cells internalized a detectable amount of polyplexes. This observation sharply contrasted with the behavior of pristine bPEI-made positive controls for which cell surface attachment was followed by a much slower internalization rate as only around 5 % of cells were YOYO-1/DNA-positive 30 min post transfection. As for total polyplex uptake, Figure 4-6(c) shows that the use of EGF-displaying polyplexes yielded up to 20 times more plasmid DNA inside the cells than untargeted polyplexes did within that time window.

4.2.5.4 EGFR-specific interaction

In order to demonstrate that enhanced internalization abilities of our targeted polyplexes was due to their specific interactions with EGFR, we took advantage of an EGFR-specific tyrosine kinase inhibitor, namely tyrphostin, that blocks the endocytosis of activated EGFR (Levitzki & Gazit, 1995), see Figure 4-7.

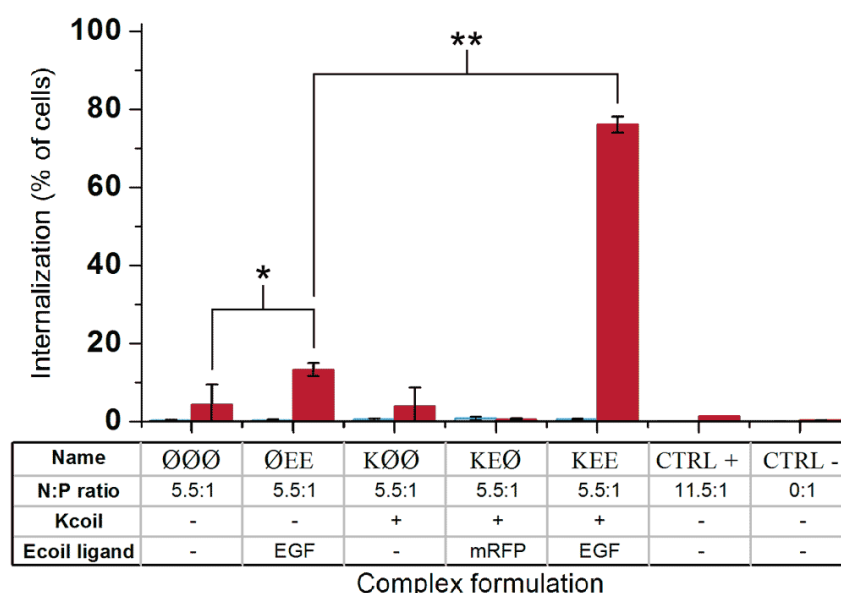


Figure 4-7: Enhanced internalization of Ecoil-EGF decorated polyplexes requires EGFR internalization. Proportion of YOYO-1-positive cells in the presence (empty columns, left) or absence (filled columns, right) of tyrphostin, an EGFR-specific tyrosine kinase inhibitor. Ligands concentrations were set to 17 nM in culture medium. The corresponding YOYO-1/DNA fluorescence associated with polyplexes was measured by flow cytometry on samples constantly kept on ice from 10 min after polyplex addition to cells. * $p < 0.05$ compared with untargeted DNA/PEI-PDP complexes in the absence of free Ecoil-EGF in culture medium (formulation ØØØ). ** $p < 0.001$ compared with a formulation lacking Kcoil (formulation ØEE).

As can be seen in Figure 4-7, first, on untreated control cells, our targeted polyplex yielded up to 76 % of YOYO-1-positive cells 10 min post transfection. Control DNA/bPEI complex added to the cells with simultaneous free EGF addition in culture medium yielded 13 % of YOYO-1-positive cells, only. Consistent with previous results, no polyplex of any other control formulation was significantly internalized by untreated cells. Second, after a 45-min pre-incubation of A431 cells with 5 μ M of tyrphostin, all polyplex formulations including our

targeted polyplex yielded no detectable uptake in this time window (as illustrated in Figure 4-8). These results thus indicated that the Kcoil peptide *per se* did not play any additional role in targeting besides recruiting the Ecoil peptide (KØØ formulation in Figure 4-7). Ecoil–EGF added to Kcoil-lacking DNA/PEI–PDP complexes had only little effect on polyplex uptake (ØEE formulation), thus indicating that i) Ecoil–EGF did not significantly bind non-specifically to polyplexes in the absence of Kcoil and ii) Ecoil–EGF immobilization through coiled-coil interaction was the key event responsible for the observed receptor targeting. To rule out any possible effect of the heterodimeric Ecoil/Kcoil motif itself, an irrelevant ligand – namely Ecoil–mRFP – was immobilized on DNA/PEI–Kcoil complexes (KEØ formulation) and yielded no uptake promotion.

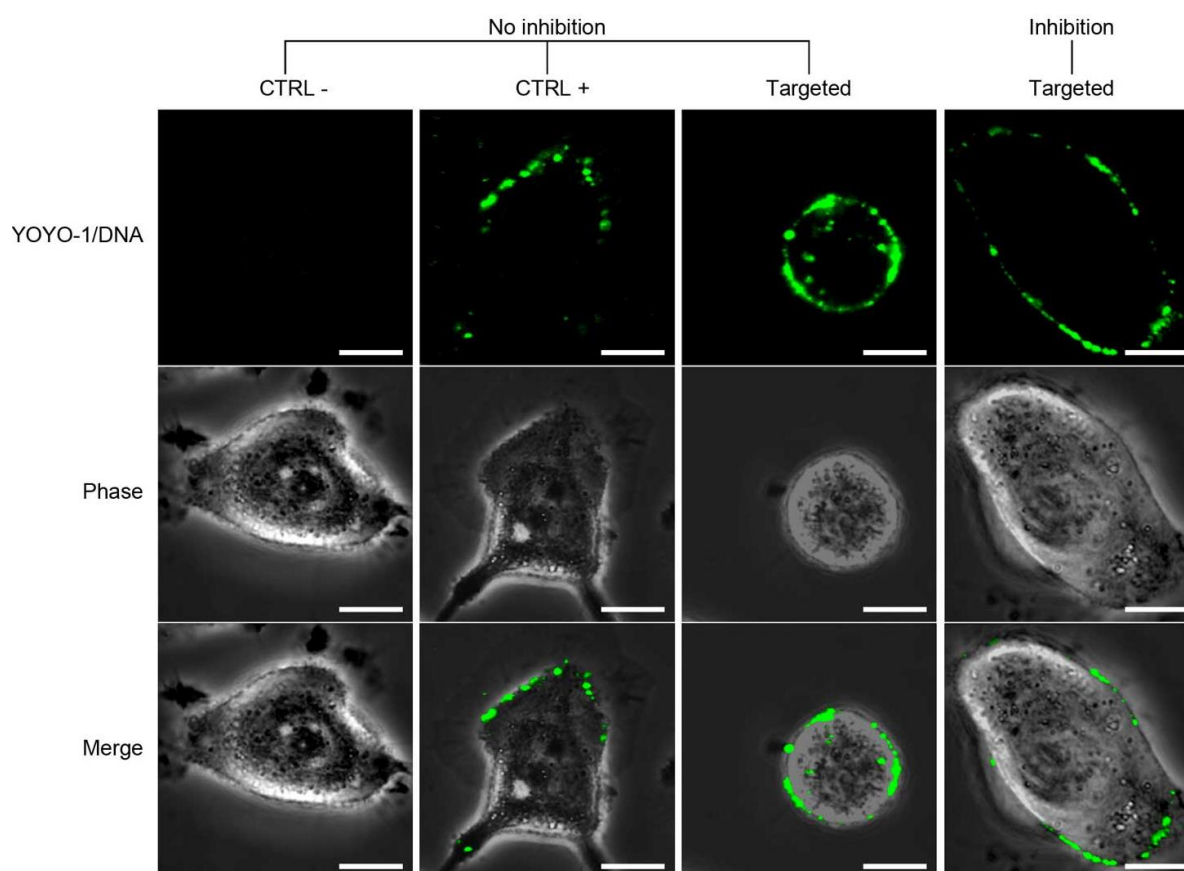


Figure 4-8 : Polyplex capture by A431 cells as monitored by fluorescence confocal microscopy. Polyplexes were made using Yoyo-1 labelled plasmid DNA and representative images were taken 10 minutes following their addition to the cells. Targeted polyplexes were formed at an N:P ratio of 5.5:1 and a targeting ligand concentration of 17 nM in culture medium. For EGFR tyrosine kinase inhibition, cells were pre-incubated with 5 μ M tyrphostin for 45 min prior to polyplex addition. Scale bar = 10 μ m.

4.2.5.5 Effect of free bPEI addition after transfection

While enhanced internalization of targeted polyplexes had been unambiguously observed, transient gene expression turned out to be inefficient, as illustrated in Figure 4-9. Targeted gene delivery yielded only *ca.* 15 % relatively to the positive control. We then verified whether the ability of our targeted polyplexes to promote reporter gene expression was correlated to the total amount of polycation in culture medium. Four hour post transfection with targeted polyplexes, we added free extra bPEI so as to equal the polycation concentration of the positive control. Several studies indeed previously reported that adding extra polycation several hours post transfection acted out in subsequent events of transfection; specifically endolysosomal escape (Thibault et al., 2011; Yue et al., 2010). BFP expression was evaluated 2 days post transfection by flow cytometry. Data collected are reported Figure 4-9. Polyplex rescue triggered by free bPEI addition increased BFP expression level by 2 when compared to positive control.

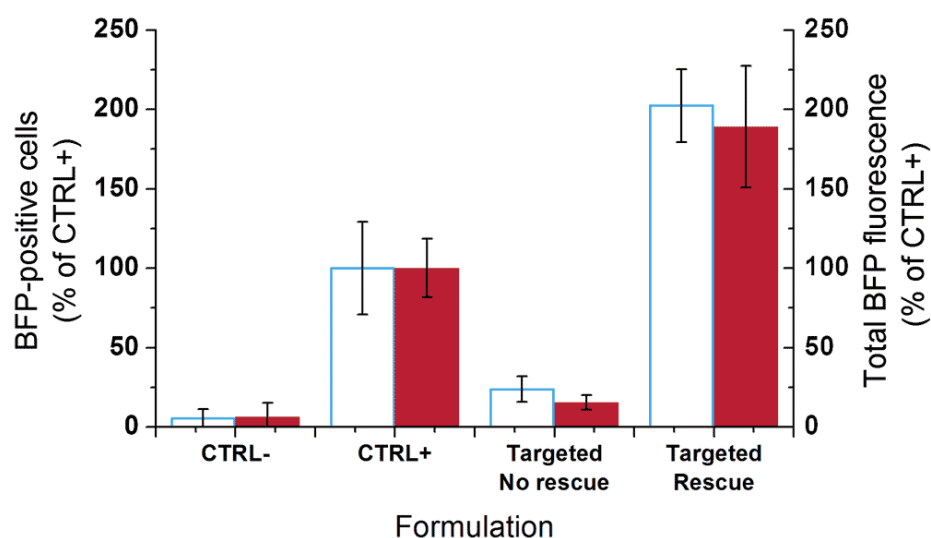


Figure 4-9 : Polyplex-mediated gene expression. Proportion of BFP-positive cells (empty columns, left) and total BFP fluorescence (filled columns, right) of A431 cells 2 days post transfection as determined by flow cytometry. The positive control values were set to 100 % as a reference. Rescue of targeted polyplexes was achieved 4 hours post-transfection by the addition of free bPEI.

4.2.6 Discussion

We have developed an approach for the controlled display of biomolecules at the surface of gene delivery nanoparticles by means of a coiled-coil interaction. We here report a proof of concept that consists in the oriented tethering of an Ecoil-tagged protein – namely Ecoil–EGF – on Kcoil-functionalized DNA/PEI complexes for EGFR-targeted gene delivery. This ligand/receptor tandem has already been investigated in a number of studies, especially on cancer research (de Bruin et al., 2007; Roepstorff et al., 2009); thus providing us with well documented knowledge and facts regarding intracellular kinetics and response to EGF/EGFR-mediated endocytosis of polyplexes. Likewise, the human epidermoid cancer derived A431 cell line was selected as a ready-to-use model cell line as it is very well known to overexpress EGFR (Haigler, Ash, Singer, & Cohen, 1978; St-Pierre & Petersen, 1992; Sturani et al., 1988).

The first building block of our structure is branched polyethylenimine being modified with a thiol-reactive linker; a starting point that had previously been reported for targeting and/or shielding purposes (Lungwitz et al., 2005; Tiera et al., 2011). Then, the procedure sequence of polyplex formation reported in Figure 4-2 was designed to prevent unwanted interaction between Kcoil peptide and DNA. That interaction was significant (data not shown) because our Kcoil peptide both features a high helical propensity and positively charged residues segregated on one side of the helix. Those two characteristics are associated with electrostatic interactions occurring with DNA phosphates (Zlotnick & Brenner, 1989), and steric complementarity with DNA major groove (Suzuki & Gerstein, 1995). In order to circumvent these interactions, DNA was first encapsulated with PEI–PDP. That primary polyplex was then subjected to conjugation with the Kcoil peptide. Analogous strategies that proved to be successful were recently used for similar reasons (Roy et al., 2009; Zeng, Wang, & Wang, 2007). The secondary polyplex thus formed displays Kcoil peptides that are available for subsequent heterodimerization with complementary Ecoil peptides. At this point, the stable nanocarrier is versatile as any Ecoil-tagged compound could be tethered to its surface by auto-assembly. We chose to verify that aspect by immobilizing Ecoil–EGF and by subsequently carrying out targeted gene delivery towards EGFR over-expressing A431 cells. However, one inherent limit of receptor targeting is the need of a close proximity between the ligand and its receptor prior to their interaction. Yet, *homing* of ligand-functionalized particles to cells bearing target receptors is *not* a feature provided by ligand-induced internalization. The particle propensity to be in the vicinity of its target cell is rather

dependent on diffusion of that particle. Subsequently, as cell surface displays a global negative charge mainly due to the presence of heparan sulfate proteoglycans, particles with higher positive surface charge will have higher kinetics of cell membrane association. This tendency has already been observed for various DNA/polymer complexes (De Smedt, Demeester, & Hennink, 2000; Kurosaki, Kitahara, Fumoto, et al., 2009) and is in good agreement with the measured uptake efficiency of our targeted polyplexes (see Figure 4-5). Highly positively charged targeted polyplexes with an N:P ratio of 5.5:1 bind to over 95% of cells within 5 min post injection, whereas weakly charged targeted polyplexes with an N:P ratio of 3:1 only reach 60 % of cells. That binding efficiency directly impacts on the subsequent uptake of polyplexes *via* receptor-mediated endocytosis. We hypothesize here a synergistic effect of both high positive surface charge and receptor targeting. Altogether our results suggest that the persistent association of polyplexes with cells is electrostatically driven, which unleashes the potential of ligand/receptor interactions. The very low uptake rate of untargeted DNA/PEI-PDP complexes formed at an N:P ratio of 5.5:1 confirms that a strong positive surface charge is not enough to explain the drastic uptake rates measured with corresponding targeted polyplexes.

Then, in order to test the flexibility of our immobilization technique, we grafted increasing amounts of Kcoil peptides on physically well-characterized primary DNA/PEI-PDP complexes onto which Ecoil-EGF has been subsequently self-assembled. We quantified the uptake response of A431 cells upon targeted transfection and revealed a “switch-mode” correlation between polyplex uptake by EGF receptor-mediated endocytosis and targeting ligand concentration. Then we further characterized the gain mediated by our targeting strategy in terms of uptake kinetics of polyplexes. De Bruin and colleagues previously reported that most of their EGFR-targeted polyplex uptake took place within the first 30 min post transfection for polyplexes targeted towards EGFR in EGFR-overexpressing HuH7 cells (de Bruin et al., 2007). Here we investigated this half hour closely by means of flow cytometry. Uptake kinetic results indicate an even faster uptake with a characteristic half-time of 3–5 min. We speculate that this rate is still limited by the attachment rate of polyplexes to the cell membrane; as the global shapes of trends reported in Figure 4-6 appear very similar for our targeted polyplex attachment, internalization and total fluorescence kinetics. To further support our hypothesis of a receptor-mediated polyplex uptake through EGFR activation by tethered EGF ligands, an inhibition experiment was conducted on a series of formulations and evidenced the specificity of our

targeting strategy towards EGFR. We ruled out the possibility of an interaction between the coiled-coil motif itself with other membrane elements during the uptake process.

Furthermore, the role of free EGF in culture medium was found to be modest (see Figure 4-7, compare formulation ØEE to ØØØ). This rules out any significant effect of free Ecoil-EGF that remains after targeted nanocarriers decoration. That point had to be tested since Schäfer and colleagues have already reported that EGF promotes macropinocytosis (Schäfer et al., 2011). Note that the maximum Ecoil-EGF concentration used for this paper was 17 nM in culture medium; the latter being high enough to activate EGFR via both major dimerization routes characterized by thermodynamic dissociation constants of 10 nM and 0.1 nM (Schlessinger, 2002).

Whereas our study unambiguously demonstrates that our nanocarrier decoration strategy is excellent to perform cell-surface receptor targeting, it does not lead to a raving increase in reporter gene expression. We postulated that the latter was caused by limited amount of polycation impeding endolysosomal escape, as such a phenomenon had already been reported by others for N:P ratios lower than 6:1 (Boeckle et al., 2004; Boussif et al., 1995; Clamme, Azoulay, & Mely, 2003; Ogris et al., 1998). Addition of free bPEI after polyplex uptake, *i.e.* 4 h after polyplex addition (Figure 4-9) led to a drastic increase in reporter protein levels (Figure 4-9), thus confirming our hypothesis. In fact, after polyplex rescue, reporter gene expression was almost 2-fold higher than that of positive control. These results compare well with other approaches using nanocarriers targeting EGFR (de Bruin et al., 2007; Zhang, B. & Mallapragada, 2011).

4.2.7 Conclusion

Polyplex uptake by transfected cells is not known to be a major bottleneck in current transient transfection approaches for r-protein production. It is rather believed that polyplex intracellular trafficking, plasmid DNA release and subsequent/concurrent nuclear import are the main limiting steps of transfection (Midoux et al., 2008). However, uptake of polyplexes through receptor-mediated endocytosis may be utilized, if properly tuned with nanocarrier unpacking kinetics, to address both intracellular trafficking and DNA release issues, and thus yield an efficient nuclear import. In that respect, the versatile and flexible protein-enhanced nanocarrier we have developed was successfully put to the test in this manuscript by addressing the targeting of a transfection vector to the epidermal growth factor receptor. In future studies, our platform

may prove to be a valuable tool for transient gene expression optimization when matched with adequate intracellular DNA release properties.

4.2.8 Acknowledgments

This work was supported by the Canada Research Chair on Protein-enhanced Biomaterials, and by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (G.D.C.). We are thankful to Ms. Lucie Bourget and Mr. Antoine W. Caron for technical support and other lab members for fruitful discussion and helpful support.

4.2.9 Note

Use of PEI for transfection may be covered by existing intellectual property rights, including US Patent 6,013,240, European Patent 0,770,140, and foreign equivalents for which further information may be obtained by contacting licensing@polyplus-transfection.com.

This is NRC publication #53182

4.2.10 References

Algar, W. R., Prasuhn, D. E., Stewart, M. H., Jennings, T. L., Blanco-Canosa, J. B., Dawson, P. E., & Medintz, I. L. (2011). The controlled display of biomolecules on nanoparticles: a challenge suited to bioorthogonal chemistry. *Bioconjug. Chem.*, 22(5), 825-858. doi: 10.1021/bc200065z

Backliwal, G., Hildinger, M., Chenuet, S., Wulhfard, S., De, J. M., & Wurm, F. M. (2008). Rational vector design and multi-pathway modulation of HEK 293E cells yield recombinant antibody titers exceeding 1 g/l by transient transfection under serum-free conditions. *Nucleic Acids Res.*, 36(15), e96. doi: 10.1093/nar/gkn423

Boeckle, S., von Gersdorff, K., van der Piepen, S., Culmsee, C., Wagner, E., & Ogris, M. (2004). Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer. *J. Gene Med.*, 6(10), 1102-1111. doi: 10.1002/jgm.598

Boucher, C., Ruiz, J. C., Thibault, M., Buschmann, M. D., Wertheimer, M. R., Jolicoeur, M., . . . De Crescenzo, G. (2010). Human corneal epithelial cell response to epidermal growth

factor tethered via coiled-coil interactions. *Biomaterials*, 31(27), 7021-7031. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.05.072

Boucher, C., St-Laurent, G., Loignon, M., Jolicoeur, M., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2008). The Bioactivity and Receptor Affinity of Recombinant Tagged EGF Designed for Tissue Engineering Applications Is Defined by the Nature and Position of the Tags. *Tissue Eng.*, 14(12), 2069-2077. doi: 10.1089/ten.tea.2008.0037

Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., & Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(16), 7297-7301. tiré de <http://www.pnas.org/content/92/16/7297.full.pdf>

Carlsson, J., Drevin, H., & Axen, R. (1978). Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunctional reagent. *Biochem. J.*, 173(3), 723-737. tiré de <http://www.biochemj.org/bj/173/bj1730723.htm>

Carpentier, E., Paris, S., Kamen, A. A., & Durocher, Y. (2007). Limiting factors governing protein expression following polyethylenimine-mediated gene transfer in HEK293-EBNA1 cells. *J Biotechnol*, 128(2), 268-280. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.10.014

Clamme, J. P., Azoulay, J., & Mely, Y. (2003). Monitoring of the formation and dissociation of polyethylenimine/DNA complexes by two photon fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.*, 84(3), 1960-1968. doi: 10.1016/s0006-3495(03)75004-8

de Bruin, K., Ruthardt, N., von Gersdorff, K., Bausinger, R., Wagner, E., Ogris, M., & Brauchle, C. (2007). Cellular dynamics of EGF receptor-targeted synthetic viruses. *Mol. Ther.*, 15(7), 1297-1305. doi: 10.1038/sj.mt.6300176

De Crescenzo, G., Litowski, J. R., Hodges, R. S., & O'Connor-McCourt, M. D. (2003). Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de Novo Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding. *Biochemistry*, 42 1754-1763. doi: 10.1021/bi0268450

De Smedt, S. C., Demeester, J., & Hennink, W. E. (2000). Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharm. Res.*, 17(2), 113-126. doi: 10.1023/A:1007548826495

Drake, D. M., & Pack, D. W. (2008). Biochemical investigation of active intracellular transport of polymeric gene-delivery vectors. *J.Pharm.Sci.*, 97(4), 1399-1413. doi: 10.1002/jps.21106

Drogoz, A., David, L., Rochas, C., Domard, A., & Delair, T. (2007). Polyelectrolyte complexes from polysaccharides: formation and stoichiometry monitoring. *Langmuir*, 23(22), 10950-10958. doi: 10.1021/la7008545

Durocher, Y., Perret, S., & Kamen, A. (2002). High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res.*, 30(2), E9. doi: 10.1093/nar/30.2.e9

Geisse, S. (2009). Reflections on more than 10 years of TGE approaches. *Protein Expr. Purif.*, 64(2), 99-107. doi: 10.1016/j.pep.2008.10.017

Haigler, H., Ash, J. F., Singer, S. J., & Cohen, S. (1978). Visualization by fluorescence of the binding and internalization of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75(7), 3317-3321. tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC392766/pdf/pnas00019-0313.pdf>

Itaka, K., & Kataoka, K. (2009). Recent development of nonviral gene delivery systems with virus-like structures and mechanisms. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 71(3), 475-483. doi: 10.1016/j.ejpb.2008.09.019

Kurosaki, T., Kitahara, T., Fumoto, S., Nishida, K., Nakamura, J., Niidome, T., . . . Sasaki, H. (2009). Ternary complexes of pDNA, polyethylenimine, and gamma-polyglutamic acid for gene delivery systems. *Biomaterials*, 30(14), 2846-2853. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.01.055

Levitzki, A., & Gazit, A. (1995). Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science*, 267(5205), 1782-1788. doi: 10.1126/science.7892601

Liberelle, B., Bartholin, L., Boucher, C., Murschel, F., Jolicœur, M., Durocher, Y., . . . De Crescenzo, G. (2010). New ELISA approach based on coiled-coil interactions. *J. Immunol. Methods*, 362(1-2), 161-167. doi: 10.1016/j.jim.2010.09.027

Lungwitz, U., Breunig, M., Blunk, T., & Gopferich, A. (2005). Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 60(2), 247-266. doi: 10.1016/j.ejpb.2004.11.011

Midoux, P., Breuzard, G., Gomez, J. P., & Pichon, C. (2008). Polymer-based gene delivery: a current review on the uptake and intracellular trafficking of polyplexes. *Curr. Gene Ther.*, 8(5), 335-352. doi: 10.2174/156652308786071014

Mintzer, M. A., & Simanek, E. E. (2009). Nonviral vectors for gene delivery. *Chem. Rev.*, 109(2), 259-302. doi: 10.1021/cr800409e

Ogris, M., Steinlein, P., Kursa, M., Mechtler, K., Kircheis, R., & Wagner, E. (1998). The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther.*, 5(10), 1425-1433. doi: 10.1038/sj.gt.3300745

Pechar, M., & Pola, R. (2012). The coiled coil motif in polymer drug delivery systems. *Biotechnol. Adv.*, 31(1), 90-96. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.003

Pham, P. L., Kamen, A., & Durocher, Y. (2006). Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein. *Mol Biotechnol*, 34(2), 225-237. doi:10.1385/MB:34:2:225

Roepstorff, K., Grandal, M. V., Henriksen, L., Knudsen, S. L., Lerdrup, M., Grovdal, L., . . . van Deurs, B. (2009). Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 10(8), 1115-1127. doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00943.x

Roy, R., Jerry, D. J., & Thayumanavan, S. (2009). Virus-inspired approach to nonviral gene delivery vehicles. *Biomacromolecules*, 10(8), 2189-2193. doi: 10.1021/bm900370p

Schäfer, A., Pahnke, A., Schaffert, D., van Weerden, W. M., de Ridder, C. M., Rodl, W., . . . Ogris, M. (2011). Disconnecting the Yin and Yang Relation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-Mediated Delivery: A Fully Synthetic, EGFR-Targeted Gene Transfer System Avoiding Receptor Activation. *Hum. Gene Ther.*, 22 1463-1473. doi: 10.1089/hum.2010.231

Schlessinger, J. (2002). Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell*, 110(6), 669-672. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00966-2

St-Pierre, P. R., & Petersen, N. O. (1992). Average density and size of microclusters of epidermal growth factor receptors on A431 cells. *Biochemistry*, 31(9), 2459-2463. doi: 10.1021/bi00124a004

Sturani, E., Zippel, R., Toschi, L., Morello, L., Comoglio, P. M., & Alberghina, L. (1988). Kinetics and regulation of the tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor in intact A431 cells. *Mol. Cell Biol.*, 8(3), 1345-1351. doi : 10.1128/MCB.8.3.1345

Suzuki, M., & Gerstein, M. (1995). Binding geometry of alpha-helices that recognize DNA. *Proteins*, 23(4), 525-535. doi: 10.1002/prot.340230407

Thibault, M., Astolfi, M., Tran-Khanh, N., Lavertu, M., Darras, V., Merzouki, A., & Buschmann, M. D. (2011). Excess polycation mediates efficient chitosan-based gene transfer by promoting lysosomal release of the polyplexes. *Biomaterials*, 32(20), 4639-4646. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.03.010

Tiera, M. J., Shi, Q., Winnik, F. M., & Fernandes, J. C. (2011). Polycation-based gene therapy: current knowledge and new perspectives. *Curr. Gene Ther.*, 11(4), 288-306. doi: 10.2174/156652311796150408

Tripet, B., Yu, L., Bautista, D. L., Wong, W. Y., Irvin, R. T., & Hodges, R. S. (1996). Engineering a de novo-designed coiled-coil heterodimerization domain for the rapid detection, purification and characterization of recombinantly expressed peptides and proteins. *Protein Eng.*, 9(11), 1029-1042. doi: 10.1093/protein/9.11.1029

Yue, Y., Jin, F., Deng, R., Cai, J., Chen, Y., Lin, M. C., . . . Wu, C. (2010). Revisit complexation between DNA and polyethylenimine - Effect of uncomplexed chains free in the solution mixture on gene transfection. *J. Control. Release*, 155 67-76. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.10.028

Zeng, J., Wang, X., & Wang, S. (2007). Self-assembled ternary complexes of plasmid DNA, low molecular weight polyethylenimine and targeting peptide for nonviral gene delivery into neurons. *Biomaterials*, 28(7), 1443-1451. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.11.015

Zhang, B., & Mallapragada, S. (2011). The mechanism of selective transfection mediated by pentablock copolymers; Part I: Investigation of cellular uptake. *Acta Biomater.*, 7(4), 1570-1579. doi: 10.1016/j.actbio.2010.11.032

Zlotnick, A., & Brenner, S. L. (1989). An alpha-helical peptide model for electrostatic interactions of proteins with DNA. The N terminus of RecA. *J. Mol. Biol.*, 209(3), 447-457. doi: 10.1016/0022-2836(89)90009-0

CHAPITRE 5 ARTICLE 3 : FAÇONNAGE DE LA SURFACE D'UN VECTEUR DE DÉLIVRANCE DE GÈNES AVEC DU DEXTRANE CARBOXYMÉTHYLÉ : UNE ANALYSE SYSTÉMATIQUE

5.1 Présentation de l'article

Dans cette section est repris l'article intitulé *Tailoring the surface of a gene delivery vector with carboxymethylated dextran: a systematic analysis*, qui a été soumis dans le journal *Biomacromolecules* en février 2015.

Les nanocapsules polymériques sont des vecteurs non viraux attractifs à des fins de délivrance de gène *in vivo*. Pour de telles applications, de nombreux obstacles biologiques sont à surmonter, et ce tant aux niveaux physiologique que subcellulaire. Dans ce contexte, chaque composante structurelle de la nanocapsule peut être optimisée au vu de ses propres défis. Ici, nous nous sommes intéressés à l'interface entre un modèle de nanocapsule de délivrance de gène et des éléments constitutifs de l'environnement physiologique lui étant pertinents. Nous avons passé au crible une chimiothèque de dextrans carboxyméthylés (CMD) pour l'enrobage électrostatique de polyplexes constitués de polyéthylèneimine (PEI) et d'ADN plasmidique (pDNA). Au travers d'une analyse systématique, nous avons évalué l'influence couplée du poids moléculaire et de la densité de charge du CMD lors de l'enrobage de polyplexe vis-à-vis de la dégradation nucléolytique, des petits ions, des protéines du plasma, des érythrocytes, et du ciblage cellulaire. Nous avons observé des tendances monotones entre chacun des deux paramètres et l'encapsulation de l'ADN. À notre surprise, ces observations n'ont pas été corrélées avec la protection de l'ADN contre la dégradation nucléolytique, cette dernière étant corrélée à l'expression de gène. L'évaluation de la stabilité des polyplexes avec une concentration physiologique en sels a indiqué que les deux paramètres étudiés avaient une influence couplée sur la prévention de l'agrégation des polyplexes. Cette influence s'est traduite en termes de stabilisation stérique et latérale plutôt qu'en terme de potentiel zêta. En revanche, ce dernier s'est avéré un fort prédicteur de l'abrogation de l'opsonisation et de l'agrégation d'érythrocytes. Ainsi, nous avons exposé la complémentarité de plusieurs caractéristiques interfaciales quant à l'utilisation de polyplexes *in vivo*, améliorant ainsi la compréhension générale du façonnage de la surface de polyplexes avec un polyanion hydrophile.

5.2 Tailoring the surface of a gene delivery vector with carboxy-methylated dextran: a systematic analysis

Charles Fortier^{a,b}, Elodie Louvier^{b,c}, Yves Durocher^{b,c}, and Gregory De Crescenzo^{a,}*

^a Department of Chemical Engineering, Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales (GRSTB), École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montreal (QC), H3C 3A7 Canada.

^b Life Sciences | NRC Human Health Therapeutics Portfolio, Building Montreal-Royalmount, National Research Council Canada, Montreal (QC), H4P 2R2 Canada.

^c Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Université de Montréal, Montréal (QC), H3C 3J7 Canada.

* Correspondence should be addressed either to gregory.decrescenzo@polymtl.ca.

5.2.1 Abstract

Polymeric nanocarriers are attractive nonviral vectors for gene delivery purposes in vivo. For such applications, numerous physiological and subcellular bottlenecks have to be overcome. In that endeavor, each structural feature of nanocarriers can be optimized with respect to its corresponding challenges. Here, we focused on the interface between a model gene delivery nanocarrier and relevant constituents of the physiological environment. We screened a library of carboxymethylated dextrans (CMD) for the electrostatic coating of positively charged nanocarriers. We evaluated the jointed influence of the CMD molecular weight and charge density upon nanocarrier coating with respect to DNase, small ions, plasma proteins, red blood cells, and target cells. Four out of 26 CMD coated nanocarriers successfully passed every screening assay, but did not yield increased reporter gene expression in target cells compared to uncoated nanocarriers. The fine-tuning of CMD for nanocarrier coating yielded a relevant shortlist of candidates that will be further tested in vivo.

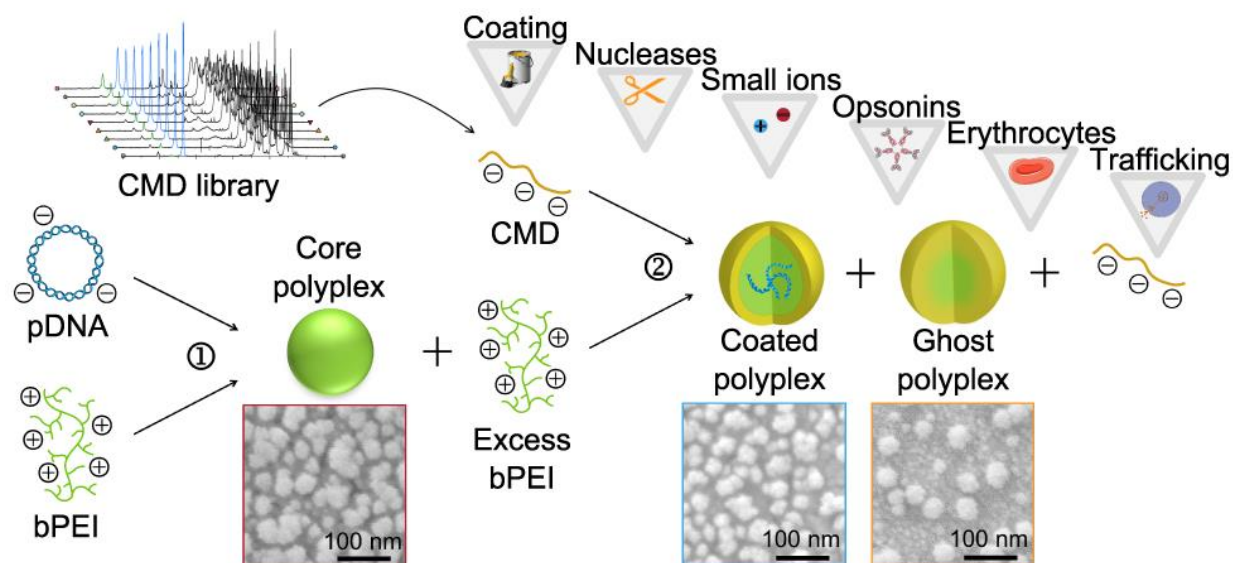


Figure 5-1: Graphical abstract.

5.2.2 Keywords

Gene delivery, Non-viral vector, Nanocapsule, Carboxymethylated dextran, Polymer coating, Polyethylenimine

5.2.3 Introduction

There is a growing body of evidence towards the feasibility of polymeric nanocarrier-based cancer gene therapy.(Yin et al., 2014; Yousefi et al., 2013) Mainly used as nucleic acid condensing agents, polymers have also been employed as coating materials(Laga et al., 2012) in an effort to decouple the bio-interface and the core of nucleic acid nanocarriers.(Fortier, Durocher, & De Crescenzo, 2014) The results of several studies on the charge density of cationic polymers – as core constituents of nanocarriers – have been reported.(Thibault et al., 2010) Yet, systematic analyses of other polymers of interest – and particularly polyanions – for the surface modification of nanocarriers are scarce.(Fortier et al., 2014; Hornof, de la Fuente, Hallikainen, Tammi, & Urtti, 2008; Martens et al., 2015; Mizrahy et al., 2011; Trubetskoy et al., 2003) Such systematic analyses in vitro should feature relevant assays that bear predictive power with respect to nanocarrier performance in vivo.(Whitehead et al., 2012; Yousefi et al., 2013)

Anionic polymers – particularly polysaccharides – have been tested as surface modifiers for nanocarrier-based gene delivery purposes.(Mizrahy & Peer, 2012; Raemdonck, Martens, Braeckmans, Demeester, & De Smedt, 2013) Significant advances have been reported in terms of systemic residence, cytotoxicity, biodegradability and cell targeting,(Amoozgar & Yeo, 2012) which were generally attributed to the nature of the polysaccharides rather than to their structure. Regarding the latter, molecular weight has already been optimized in several studies,(Hornof et al., 2008; Martens et al., 2015; Mizrahy et al., 2011) but coupled fundamental properties of these polyanions such as molecular weight and charge density have yet to be concomitantly optimized. We sought to carry out a systematic analysis on those parameters in order to aid the design of future nanocarriers. We based our approach on dextran, a well-characterized neutral biopolymer.

Dextran and its derivatives have found relevant applications in biomedical engineering and healthcare. For instance, aqueous solutions of dextran featuring high oncotic pressure, low antigenicity, low thrombogenicity and low erythrocyte aggregation have been used as blood volume expanders to treat moderate blood loss.(Heinze et al., 2006) Carboxymethylated dextran (CMD) has been reported to feature additional relevant properties, such as higher systemic residence half-life compared to dextran,(Chang, Crawford, & West, 1980) favorable uptake by tumor cells,(Wotschadlo et al., 2009) and the ability to electrostatically coat positively charged nanoparticles.(Wotschadlo et al., 2009) Dextran and CMD being highly hydrophilic, flexible and easy to functionalize, these polymers have also been employed as low-fouling versatile coatings that limit non-specific adsorption at the surface of Surface Plasmon Resonance (SPR)-based biosensor chips(Heinze et al., 2006) and multiple-well plates for Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA).(Liberelle, Merzouki, & De Crescenzo, 2013) Taken together, those properties make the CMD polymer family an interesting candidate for nanoparticle coating in the context of nucleic acid delivery for gene therapy.

The interactions of dextran- and CMD-coated nanoparticles with human cells have already been studied in vitro and in vivo with magnetic nanoparticles.(Moore, A., Weissleder, & Bogdanov, 1997; Schwalbe et al., 2006; Wilhelm et al., 2003; Wotschadlo et al., 2009) These reports form an encouraging picture regarding the use of CMD as a surface modifier in terms of cytocompatibility and cellular uptake. In particular, although no known cell receptor have been associated with the uptake of dextran by cells,(Moore, A. et al., 1997) CMD-coated nanoparticles exhibited a degree of cell selectivity towards tumor cells in uptake studies.(Wotschadlo et al.,

2009) The authors conjectured that the distinctive α -1 \rightarrow 6 glycosidic linkage of dextran was involved in that latter point. In the field of gene therapy, only few reports can be found on the use of either dextran or CMD for nucleic acids delivery, a majority of which dealing with polymer conjugates (Jiang, D. & Salem, 2012; Kim, J. S. et al., 2013; Raemdonck et al., 2013; Sun, Y. X., Zhang, Cheng, Cheng, & Zhuo, 2008) rather than with nanoparticle coating. (Ning et al., 2011) Besides, results and discussions from these studies were mostly focused on a single polymer formulation of given molecular weight and charge density. (Kim, J. S. et al., 2013; Ning et al., 2011; Sun, Y. X. et al., 2008) Thus, CMDs arguably appear to be relevant biomaterials in the context of the surface modification of nanoparticles in various cancer therapies.

Here we carried out a systematic analysis on the use of CMD for the coating of a model nanocarrier. More precisely, we postulated that the molecular weight and the degree of carboxymethylation of the polymer were two parameters worth optimizing for the electrostatic coating of positively charged nanoparticles with CMD. We thus tested a CMD library encompassing a large spectrum of molecular weights and charge densities. As a model gene delivery nanoparticle, we chose branched polyethylenimine (bPEI)/plasmid DNA (pDNA) complexes, referred here as polyplexes, that are known to feature high transfection capabilities *in vitro* but poor *in vivo* outcomes. (Lungwitz et al., 2005) Schematically, on the one hand bPEI – a strongly positive polyelectrolyte – is able to condense pDNA and to buffer the endosomes so as to escape lysosomal degradation. (Wightman et al., 2001) On the other hand, bPEI exhibits a dose-dependent cytotoxicity, especially in its free form, and it has been reported to cause harmful host responses including erythrocyte aggregation, cytopenia, and capillary clotting *in vivo*. (Boeckle et al., 2004; Lungwitz et al., 2005) As such, bPEI/pDNA polyplexes represent a valid core nanoparticle to coat with CMD. We chose an amine of bPEI-to-phosphate of pDNA (N:P) ratio of 6:1 to prepare core polyplexes, as that formulation has often been used with this polymer. (Grayson, Doody, & Putnam, 2006; Schaffert et al., 2011)

After determining the appropriate amounts of CMD to be added to warrant colloidal stability of our polyplexes, the jointed impact of charge density and chain length of our CMD upon polyplex stability, DNA protection to nuclease, plasma protein adsorption and erythrocyte aggregation were investigated. At last, to implement our *in vitro* cell-based assays, we chose the human cancer-derived epidermal growth factor receptors (EGFR)-bearing A549 cells. This cell line with moderately over-expressed EGFR has already been used as a model target in cancer

research.(Kickhoefer et al., 2008; Kim, I.-Y. et al., 2009) Besides, using this cell line allowed us perform a proof-of-concept biofunctionalization of CMD to target EGFR.

5.2.4 Materials and Methods

5.2.4.1 Chemical reagents and biomolecules

Divinyl sulfone (DVS, 99.7% purity), Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) hydrochloride solution (0.5 M), HEPES (99.5+% purity), monobromoacetic acid (99+% purity), 2-mercaptoethanol (99+% purity), branched PEI 25 kDa (99+% purity), Hoechst 33342 (98+% purity), DNase I (type IV from bovine pancreas), heparin (sodium salt, grade 1-A), and plasma from human (pooled, in 3.8% trisodium citrate) were purchased from Sigma-Aldrich Canada, Ltd. (Oakville, ON). All dextrans (technical grade T) were purchased from Pharmacosmos A/S (Holbaek, Denmark). Deuterium oxide (99% purity) was purchased from Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, MA). DMEM, YOYO-1 iodide (1 mM solution in DMSO), and SYBR Safe (10,000X in DMSO), were purchased from Invitrogen Corp. (Burlington, ON). HyClone Cosmic fetal calf serum (FCS) was obtained from Thermo Scientific, Ltd. (Pittsburgh, PA). Accutase (in Dulbecco's PBS containing 0.5 mM EDTA) was obtained from Innovative Cell Technologies, Inc. (San Diego, CA). Cysteine-tagged Kcoil peptides were synthesized by the peptide facility at the University of Colorado (Denver, CO) and aliquoted in acetic acid (0.1% v/v) upon reception. Ecoil-tagged EGF (Ecoil-EGF) was produced in HEK293-6E cells and was purified by immobilized metal-ion chromatography as previously described (Boucher et al., 2008). The purified protein was then desalted, quantified by absorbance at 280 nm on a Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) before being sterile-filtered, aliquoted and stored at -80°C until use. Quantification was confirmed by ELISA with the Human EGF DuoSet from R&D Systems (Minneapolis, MN), and purity was evaluated by SDS-PAGE.

5.2.4.2 Preparation and characterization of carboxymethylated dextrans and conjugates

The carboxymethylation of dextrans was adapted from a previously described protocol.(Liberelle et al., 2013) CMD obtained from the same technical grade dextran were prepared from a common batch reaction whereby fractions were quenched at different times. For example, dextran T70 (65 kDa, 800 mg) was dissolved in ultrapure water (13 mL) with NaOH (5

M). The reaction was initiated by adding monobromoacetic acid (9 mL, 2 M) to the reaction mixture. The reaction was carried out at room temperature under constant stirring. Fractions (2.75 mL) were quenched with HCl (0.45 mL, 14.1 M) at 8 different times starting from 2.65 min up until 120 min. The nomenclature of CMD corresponds to the rounded molecular weight in kDa and carboxymethylation time in min (*e.g.* CMD70-30). Each fraction was subsequently desalted by 5 consecutive centrifugal filtrations in ultrapure water using Amicon Ultra-15 devices with a cut-off of 10 kDa before freeze-drying.

The degree of carboxymethylation of each CMD was evaluated by ^1H -NMR. Samples from each polymer were dissolved in deuterium oxide (5 g/L) to be evaluated on a Varian Unity Inova 400 MHz instrument (Agilent Technologies, Inc., Mississauga, ON). Samples were probed at 50°C, and the H₂O signal was pulsed out of the spectra. Chemical shifts were derived relatively to tetramethylsilane.

For the preparation of Kcoil-peptide-conjugated CMD (CMD70-30-Kcoil), CMD70-30 was first modified with divinyl sulfone by adapting the method described by Yu *et al.* (Yu & Chau, 2012). Briefly, CMD70-30 powder was dissolved in ultrapure water (0.34 M of hydroxyl groups) with NaOH (0.1 M). Then, pure DVS was quickly added (0.43 M). After 3 minutes, HCl (5 M) was added to decrease the pH down to 5. The resulting CMD70-30-VS intermediate was then purified by 5 consecutive centrifugal filtrations in ultrapure water using an Amicon Ultra-15 device with a cut-off of 10 kDa. Subsequently, CMD70-30-VS (2.5 μM of macromolecules) was diluted in PBS (10 mM, pH 7.4) with TCEP (5 mM) and Kcoil (De Crescenzo, Litowski, et al., 2003) (14.34 μM). The reaction mixture was agitated in the dark for two days and ultimately quenched with 2-mercaptoethanol (50 mM). The final CMD70-30-Kcoil was similarly purified with a 10-kDa cut-off Amicon Ultra-15 device. The Kcoil:CMD ratio was evaluated to be *ca.* 4.9:1 by size exclusion chromatography (see Supplemental Figure A-0-6).

5.2.4.3 Preparation of polyplexes

All solutions were prepared at room temperature in water buffered with HEPES (10 mM, pH 7.4), referred to as the complexation buffer. To form polyplexes, one volume of bPEI was added to one volume of pDNA solution (40 $\mu\text{g/mL}$ of pTT-BFPq plasmid coding for the blue fluorescent protein BFP) (Durocher et al., 2002) to reach an N:P ratio of 6:1. The resulting

suspension was immediately vortexed and was further incubated for 5 min to form core polyplexes. Subsequently, one volume of CMD was added, and the resulting mix was immediately vortexed and further incubated for 30 min to reach a C:N:P ratio of 3:6:1 unless otherwise specified. For Kcoil-containing polyplexes, a mix of CMD and CMD-Kcoil was used at that step in order to adjust the Kcoil concentration. Finally, one volume of Ecoil-EGF (0.68 μ M) was added, and the final suspension was immediately vortexed and further incubated for 5 min to form targeted coated polyplexes.

5.2.4.4 Agarose gel electrophoresis

For gel shift assays focused on polyplex cohesion, samples (130 ng of pDNA) were loaded in each well in a 1% ^w/_v agarose Tris-acetate EDTA buffer gel stained with SYBR Safe (1 \times). Electrophoresis was carried for 30 min at 120 V and 400 mA. Gels were imaged with a ChemiDoc MP System (Bio-Rad Ltd., Mississauga, ON). Quantitative band fluorescence analyses were carried out with Image Lab 5.0 and ImageJ.

For polyplex challenging with DNase I, we adapted a previously reported method (Sawant et al., 2012). Briefly, polyplexes were prepared as described above, and were then incubated with DNase I (0.2 Kunitz unit/ μ g of DNA) at 37°C for 30 min, after which DNase I activity was stopped by the addition of EDTA (5 mM). Polyplexes were then dissociated by a 30-min incubation with heparin (5 mg/mL) at 37°C. Finally, samples (50 ng of pDNA) were loaded on agarose gels and were processed as mentioned above.

5.2.4.5 Dynamic light scattering

Dynamic light scattering (DLS) for hydrodynamic diameter and zeta potential measurements were performed on a ZetaSizer Nano ZS (Malvern instruments, Ltd.) in manual mode with the Zetasizer software in order to monitor the kinetics of salt-induced aggregation. The following sequence was used: a core polyplex suspension was formed and was then probed thrice for hydrodynamic diameter by 6 runs of 6 seconds each; then CMD was added as described earlier. The suspension was then split in two for subsequent size and zeta potential measurements, as the latter measurement may tamper with the sample. The coated polyplexes were similarly probed thrice before the addition of an appropriate volume of 3 \times PBS to raise the

salt concentration up to physiological level. The hydrodynamic diameter of each formulation was then probed every 15 s for 15 min (3 runs of 3 s each) to evaluate aggregation kinetics; and the initial slope in nanometers per min was extracted from the data.

5.2.4.6 Scanning electron microscopy

Polyplex suspensions were sprayed on a silicon wafer substrate that was then air-dried. After gold sputter-coating with an Agar Manual Sputter Coater (Marivac, Inc., Gore, QC), nanoparticles were imaged in high vacuum mode at 20 kV on a Quanta 200 FEG environmental scanning electron microscope (SEM) (FEI Company, Hillsboro, OR).

5.2.4.7 Adsorption of plasma proteins on polyplexes

Polyplex suspensions were prepared as described above. Each one was then incubated with human plasma (2% v/v) for 30 min at 37°C, after which samples were centrifuged at 20,000×g for 30 min to pellet the polyplexes. The supernatant was carefully removed, and the pellet was rinsed once with complexation buffer. Whole pellets (1.3 µg of pDNA) were then dissociated in 1× non reductive SDS-PAGE loading buffer for 10 min at 70°C and were finally processed by SDS-PAGE with Coomassie staining.

5.2.4.8 Erythrocyte aggregation assay

Erythrocytes from sheep (50% suspension in alsevers, Rockland, Inc., Gilbertsville, PA) were washed three times in PBS by centrifugation at 400×g for 10 min and were then diluted fivefold in PBS. Polyplexes were prepared in 1× PBS as described above for DLS experiments. Immediately after addition of PBS to the preformed polyplexes, erythrocytes were further diluted tenfold with polyplexes in 48-well plates (final volume of 250 µL per well). After a 30-min incubation at 37°C under 120 RPM shaking, 3 270 µm × 360 µm phase images were randomly taken from each well with an AX10 microscope (Zeiss, Peabody, MA). A microscopic aggregation index (MAI, corresponding to the fraction of the surface covered with erythrocytes) was derived from an automated particle analysis performed with ImageJ.

5.2.4.9 Cell culture

A549 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FCS, further referred to as complete medium. Cultures were kept at 37°C in a humidified, 5%-enriched CO₂ and water-jacketed incubator. For passages and seedings, Accutase was used to gently detach cells. A given culture was maintained for no more than 15 passages until another cell aliquot was thawed.

5.2.4.10 Transfection

Eighteen hours before transfection, A549 cells were distributed in 24-well plates (0.5 mL, *ca.* 80,000 cells per mL) to let them settle on the culture plate surface and reach *ca.* 80% of confluence at the time of transfection. For each well, the medium was discarded just before adding the polyplex suspension diluted tenfold in fresh complete medium that was quickly vortexed. After 4 hours post transfection (hpt), suspensions were discarded and wells were rinsed with PBS. Fresh complete medium containing free bPEI to a virtual N:P ratio of 24:1 was ultimately added.

5.2.4.11 Flow cytometry

To study the uptake of polyplexes, pDNA was stained with YOYO-1 at a ratio of 1 dye molecule per 50 base pairs. Two days post transfection (dpt), cells were treated with Accutase. Aggregates from each sample were removed by filtration through a 310- μ m Nitex mesh mounted on a 1-mL syringe. Flow cytometry was performed on an LSR II (Becton-Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ). Ten thousand live cells (from events gated in a side scatter versus forward scatter dot plot) were gated to count YOYO-1-positive cells as well as BFP-positive cells on the FACSDiva software.

5.2.4.12 Confocal microscopy

Detached cells (2 mL, 80,000 cells per mL) were seeded on 35-mm glass bottom dishes (MatTek Corp., Ashland, MA). Five minutes before transfection, cells were stained with Hoechst 33342 (5 μ M) in complete medium at 37°C. Images were captured 10 minutes post transfection (mpt) and 4 hpt using an FV10i-DOC confocal microscope (Olympus Corp., Tokyo, Japan) with a 1.35 NA 60 \times oil-immersed objective. Live cells were imaged in an INUBG2E-

FV10i 5%-enriched CO₂ water-jacketed incubator stage (Tokai Hit CO., Ltd., Fujinomiya, Japan).

5.2.4.13 Statistical analysis

Statistical significance annotations are the result of unpaired two-tailed Student's *t*-test. * indicates $p < 0.05$; ** indicates $p < 0.01$; and # indicates no significant difference at 5%.

5.2.5 Results and discussion

5.2.5.1 Synthesis of the CMD library

To quantify precisely the degree of carboxymethylation (*dcm*) of our CMDs, each of them was first characterized by ¹H-NMR spectroscopy. We took advantage of the signal yielded by the hydrogen borne by the anomeric carbon C1 of the anhydroglucose unit (see Figure 5-2) to derive the *dcm* at position C2. We then derived the total *dcm* (on either positions C2, C3 or C4) by taking into account the known relative proportions of carboxymethylation on those sites in our reaction conditions, *viz.* C2:C3:C4 12:5:8 (Krentsel et al., 1997). The *dcm*, the mass (including the mass increase resulting from the addition of the carboxymethyl moieties) as well as the charge density (expressed in negative charge per kDa, \ominus/kDa) for the 26 CMDs forming our library are listed in Table 5-1.

5.2.5.2 Formulation of CMD/bPEI/pDNA coated polyplexes

Core polyplexes resulting from the complexation of bPEI and pDNA were obtained using a N:P ratio of 6:1. Upon formation, core polyplexes remained stable for at least an hour in complexation buffer (HEPES, 10 mM, pH 7.4) (data not shown), in good agreement with other reports (Ogris et al., 1998; Wightman et al., 2001). Then, we incubated core polyplexes with CMD for at least 30 min in order to let the ternary mix reach equilibrium. By adding CMD to bPEI/pDNA polyplexes, our rationale was to coat preformed core polyplexes as well as to complex residual free bPEI in the suspension.

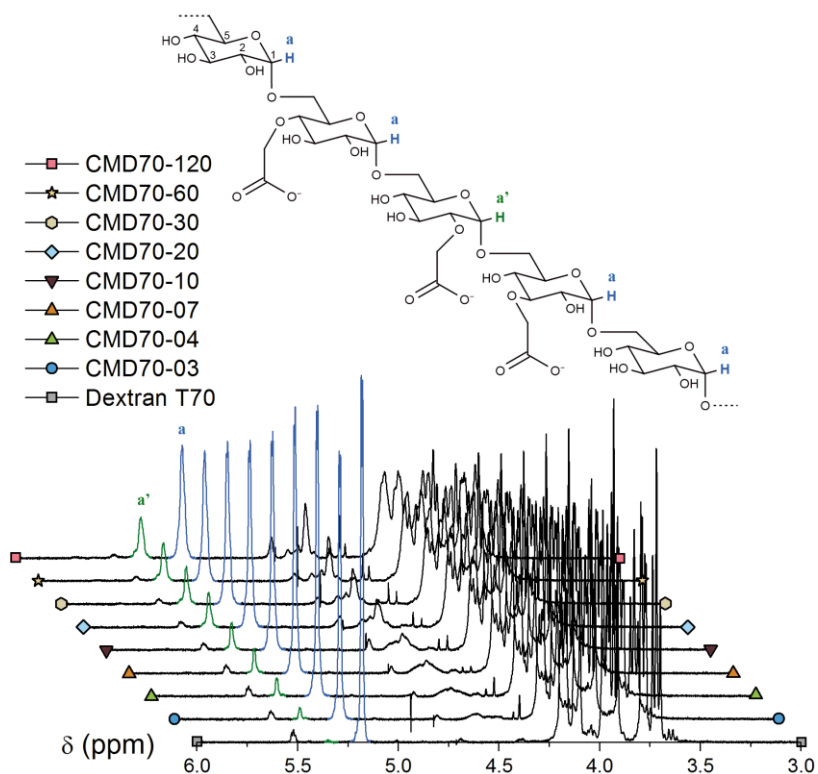


Figure 5-2 : Schematic molecular structure of CMD (top) and ¹H-NMR spectra of the 70 kDa CMD series (bottom). Anomeric hydrogen atoms corresponding to pristine or modified anhydroglucose units (a and a') are highlighted and associated with their corresponding peaks in the given spectra. The nomenclature of our dextran derivatives is described in Table 5-1.

We first evaluated the impact of incubating core polyplexes with increasing amounts of CMD upon the size of the resulting ternary polyplex by measuring the average hydrodynamic diameter and zeta potential for each nanoparticle suspension. The carboxylate-to-amine-to-phosphate or C:N:P ratio was used to describe each formulation. We hypothesized that a minimal amount of CMD would be required to decorate the bPEI/DNA polyplexes while complexing all free bPEI (thus preventing the latter from promoting the aggregation of CMD-coated nanoparticles). The data collected for representative CMDs from our library are reported on Figure 5-3. As expected, when core polyplexes were incubated with CMD at a C:N:P ratio of 0.5:6:1 or 1:6:1, polyplexes with a positive zeta potential were observed (Figure 5-3B). When incubated with higher amounts of CMD (C:N:P of 3:6:1 and higher ratios), newly decorated polyplexes remained stable with no measurable change in hydrodynamic diameter (Figure 5-3A) and with a recharged zeta potential plateauing at a range of negative values (Figure 5-3B).

Table 5-1 : Characteristics of the 26 polymers forming our CMD library¹.

1: Note that the name of each CMD indicates the size of the dextran used (first number, in kDa) and the duration of the carboxymethylation reaction (second number, in min)

	CMD10-10	CMD10-20	CMD10-30	CMD10-60	CMD10-120	CMD40-02	CMD40-03	CMD40-05	CMD40-10	CMD40-20	CMD40-30	CMD40-60	CMD40-120
Precursor	Dextran T10					Dextran T40							
<i>dcm (%)</i>	17.4	25.9	33.0	44.5	73.2	3.9	6.2	8.8	16.4	27.2	34.8	45.2	57.9
<i>Charge density (⊖/kDa)</i>	1.01	1.46	1.82	2.37	3.58	0.24	0.37	0.53	0.96	1.53	1.91	2.40	2.96
<i>Molecular weight (kDa)</i>	10.5	10.8	11.1	11.5	12.5	39.0	39.4	39.7	40.8	42.2	43.3	44.7	46.5
	CMD20-10	CMD20-20	CMD20-30	CMD20-60	CMD20-120	CMD70-03	CMD70-04	CMD70-07	CMD70-10	CMD70-20	CMD70-30	CMD70-60	CMD70-120
Precursor	Dextran T20					Dextran T70							
<i>dcm (%)</i>	19.4	30.5	35.0	47.4	56.3	7.6	11.7	16.8	23.7	32.8	39.4	48.6	56.9
<i>Charge density (⊖/kDa)</i>	1.12	1.70	1.92	2.50	2.89	0.46	0.70	0.98	1.35	1.81	2.13	2.56	2.92
<i>Molecular weight (kDa)</i>	23.0	23.8	24.2	25.1	25.8	66.8	67.7	68.9	70.5	72.6	74.2	76.3	78.2

We previously reported that for an N:P ratio of 6:1, bPEI/pDNA polyplexes accounted for *ca.* N:P 2.5:1 out of total 25-kDa bPEI, with the remaining *ca.* N:P 3.5:1 excess polycation being in free form (Fortier et al., 2013); in good agreement with the literature (Boeckle et al., 2004; Niebel et al., 2014). Here, we observed that at a C:N:P ratio between 1:6:1 and 1.5:6:1, zeta potential reversal occurred along with strong aggregation in complexation medium. The acidity range of the carboxymethyl moieties of CMD indicates that carboxylate is the preponderant form at physiological pH (Miyajima, Yoshida, & Högfeldt, 1993). Conversely, the N:P ratio of the core polyplex formulation (2.5:1) suggests that roughly 1 every 2.5 amino groups in bPEI is protonated when complexed with a polyelectrolyte at pH 7.4, if we assume that almost all the positive charges of a given bPEI chain can interact with the negative charges displayed by pDNA. That led us to conclude that for the remaining free bPEI in solution (corresponding to N:P 3.5:1 out of 6:1), only *ca.* 1.4 out of 3.5 would be protonated when complexed with excess CMD, in good agreement with the observed threshold C:N:P ratio between 1:6:1 and 1.5:6:1 in coated polyplex formulation (Figure 5-3A-B). For the rest of the study, we chose to work at a C:N:P ratio of 3:6:1, which consistently yielded polyplexes in the 100-nm range.

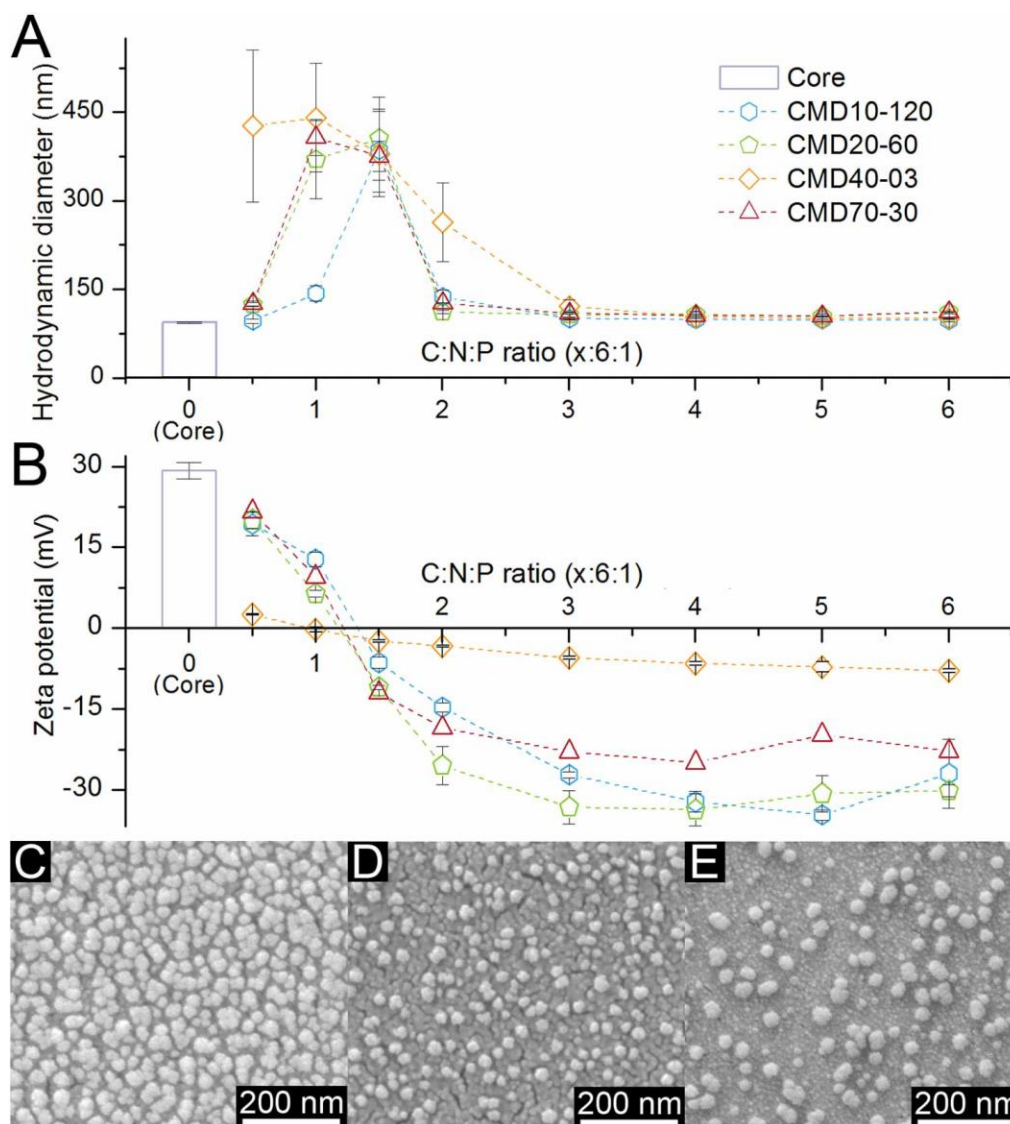


Figure 5-3 : Dependence of the size (A) and charge (B) of polyplexes on the C:N:P ratio; representative scanning electron micrographs (SEM) of polyplexes at the C:N:P 3:6:1 ratio (C–E). For dynamic light scattering (DLS) measurements, core polyplexes at an N:P ratio of 6:1 were incubated with varying amounts of either CMD10-120, CMD20-60, CMD40-03 or CMD70-30. The zeta potential and the hydrodynamic diameter were measured in complexation buffer. SEM micrographs illustrate core polyplexes at an N:P ratio of 6:1 (C), polyplexes coated with CMD70-30 at a C:N:P ratio of 3:6:1 (D), and ghost polyplexes made of bPEI and CMD70-30 at a C:N ratio of 3:3.5 (E).

In an effort to best characterize our formulations, we also conducted titrations of bPEI alone by CMD70-30, which yielded to the formation of ghost polyplexes in the 100-nm hydrodynamic diameter range (see Supplemental Figure A-0-1). Our DLS results indicated that a C:N ratio of *ca.* 0.4:1 corresponded to charge equivalence, as suggested by both a strong aggregation (Supplemental Figure A-0-1A) and an annulled zeta potential (Supplemental Figure A-0-1B) of these polyplexes. Those observations unambiguously validated the protonation degree of bPEI we postulated (see above) and the nanoparticulate nature of ghost polyplexes that were also observed by scanning electron micrograph (SEM) (Figure 5-3E). SEM and DLS measurements were not in agreement for the size of the particles. SEM observations may lead to an underestimation of the size of these nanoparticles as samples had to be dehydrated and adsorbed on a substrate for imaging (Buschmann et al., 2013). Conversely, the hydrodynamic diameter deduced from DLS measurements might have been over-estimated for several reasons: first, the assumption that the shape of our polyplexes was spherical does not hold true (Figure 5-3C-E); second, a subpopulation of oligomerized nanoparticles might have resulted in an over-estimation of the intensity-weighted hydrodynamic diameter as larger particles scatter more light than smaller ones (Niegel et al., 2014).

5.2.5.3 Encapsulation and protection of pDNA

Once the physical relevance of coating bPEI/pDNA polyplexes with CMD was asserted, we carried out a biophysical characterization of coated polyplexes generated from our CMD library. First, the question whether CMD displaced pDNA from polyplexes was addressed by gel shift assays (Figure 5-4). It appeared that an increase in charge density and to a lesser extent in molecular weight caused pDNA to migrate in the agarose gel in the form of a smear. Those results suggest that CMD can compete with pDNA if the charge density of the former is high enough (see Supplemental Figure A-0-2A), that is, close or higher than the charge density of DNA: *ca.* 3 \ominus /kDa. We assumed that there exists a threshold for the charge density of the polyplex-coating polyanion beyond which resulting assemblies are no longer fit for *in vivo* gene delivery. For instance, heparin – that we used to dissociate our polyplexes – has a charge density that is beyond that threshold. We estimated that CMD40-120 and CMD70-120 also crossed that threshold, as both caused more than 10% of total pDNA to smear out of the wells in the agarose gels (see Figure 5-4 and Supplemental Figure A-0-2A).

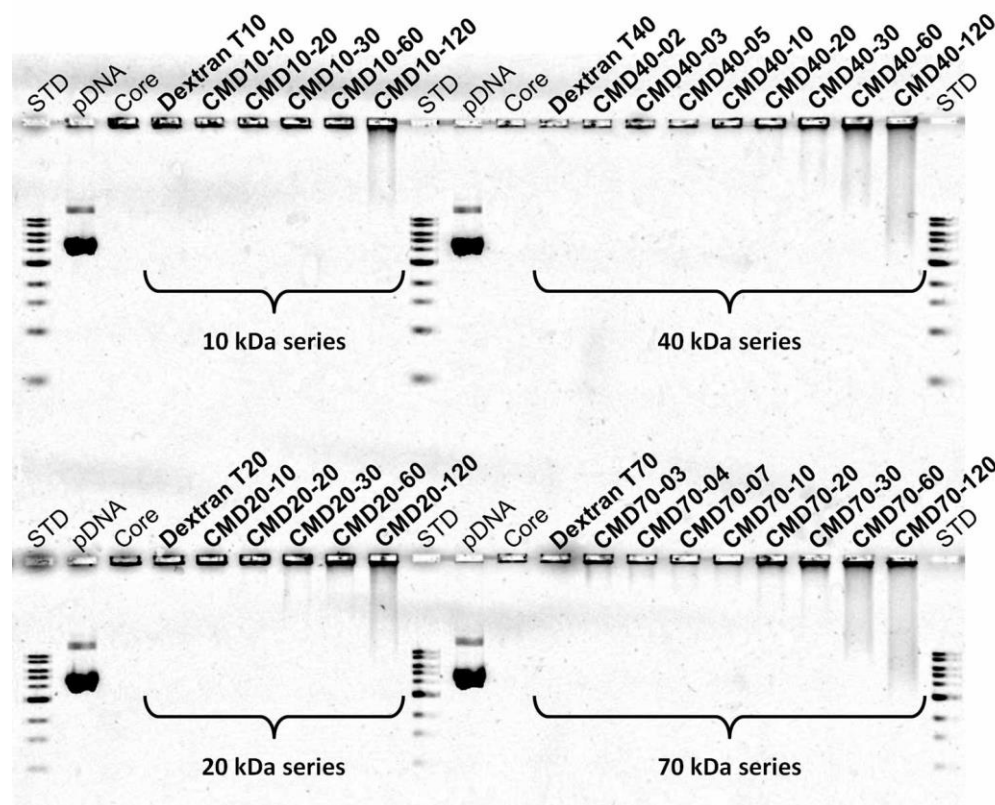


Figure 5-4 : Influence of CMD on encapsulated pDNA release from polyplexes. Representative electrophoretic patterns of coated polyplexes and controls on agarose gel.

Then, in order to test whether pDNA was still protected against nucleolytic degradation upon coating of polyplexes with CMD, we challenged our polyplexes suspensions with DNase I. We then analyzed the profile of the pDNA cargo in agarose gel electrophoresis (Figure 5-5). When unchallenged control core polyplexes were subjected to dissociation with heparin, they revealed a strong predominance of the supercoiled form, similarly to the unchallenged naked pDNA control. For every polyplex formulation that was challenged with DNase I, the fraction in relaxed form increased. It seems thus reasonable to assume that the experimental conditions for the challenging with DNase I caused that increase, regardless of the polyplex formulation.

Surprisingly, results indicated a significant degradation of pDNA from polyplexes coated with CMD40-03 and with CMD70-03, whereby a smear of low molecular weight DNA fragments appeared on the gel. That smear was accompanied with a brighter band identified as linearized pDNA for those two formulations and their neighboring ones. As that sensitive spot seemed to correlate with a narrow charge density range, we pooled additional CMDs from

different batches in order to study that effect in greater detail. Results summarized in Supplemental Figure A-0-3 indicate that CMDs with a charge density between 0.3 and 0.4 \ominus /kDa failed to protect pDNA from DNase I in the conditions of our tests. That range corresponds to one carboxymethyl on every 20 to 15 anhydroglucose units along the backbone of CMD. Those puzzling observations warrant further investigation on the interactions located at the polyplex interface.

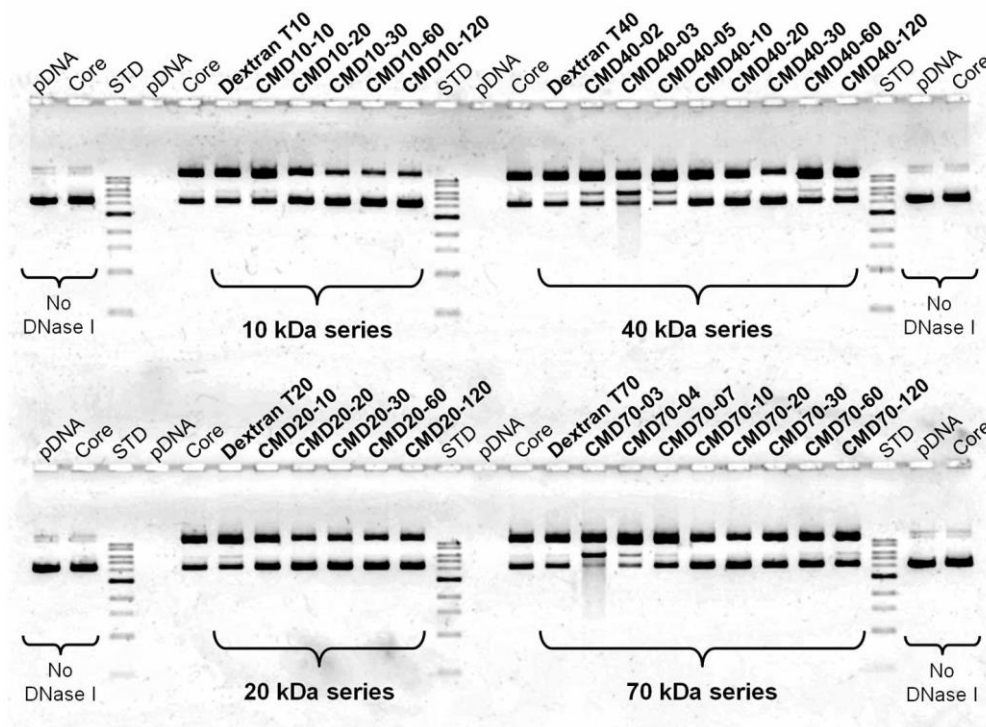


Figure 5-5 : Influence of CMD on the ability of polyplexes to protect pDNA against DNase I. Representative electrophoretic patterns of coated polyplexes and controls after DNase I challenging followed by polyplex dissociation. Naked pDNA controls challenged by DNase I were completely degraded. Controls that were not challenged by DNase I are presented on the two first and the two last wells of each front of the agarose gel.

Apart from that narrow charge density range, a slight correlation was found between pDNA displacement by CMD (smeared pDNA on Figure 5-4) and pDNA protection against DNase I (degraded pDNA on Figure 5-5) (see Supplemental Figure A-0-2B). This correlation probably indicates that the pDNA displaced by CMD was degraded by DNase I, but the encapsulated pDNA was well protected. Still, the dissimilarities between the overall results of

those two tests based on agarose gel electrophoresis clearly show that they probe distinct polyplex features. Our results thus highlight both assays should be carried out when characterizing a gene delivery vector. It is also of interest to note that we used 0.2 Kunitz unit of DNase I per microgram of pDNA for our challenging assays. We hypothesized that such conditions *in vitro* did not reflect the actual nuclease activity encountered by polyplexes during transfection. Therefore, it seemed reasonable to assume that *ca.* 30% degradation of cargo pDNA in these challenging conditions did not correlate with as much degradation of pDNA throughout the transfection process. Rather, we believe that such a stringent test allowed us to estimate the stability of polyplexes. By gaining insight into the entrapment tightness of cargo pDNA, we could then anticipate the appropriate release of the latter during transfection.

5.2.5.4 Size, charge, and aggregation trends

We then characterized the various polyplexes we generated by DLS. The zeta potential of freshly formed polyplexes was measured in complexation buffer (Figure 5-6A). For the first three CMD series, we observed that the zeta potential of coated polyplexes was strongly correlated to the charge density of the CMD but not to their molecular weight. Unexpectedly, the dextran T70 caused a significant decrease in zeta potential. That influence of a longer polymer chain translated into a markedly stronger charge reversal of polyplexes coated with CMDs of the 70 kDa series, until the zeta potential plateaued to *ca.* -24 mV at 1.35 \ominus /kDa.

The size distribution was monitored after adding salt at a physiological concentration (Figure 5-6B). For all formulations, the polydispersity index (PdI) remained within 0.1 and 0.3 (data not shown). Such PdI values are expected when dealing with slightly heterogeneous populations comprising plasmid-containing polyplexes and ghost polyplexes that are not spherical (see Figure 5-4). As expected, significant aggregation was observed both for core polyplexes and upon addition of all pristine dextrans. The two lighter CMDs with the lowest charge density failed to yield stable polyplexes in complexation buffer, preventing us from evaluating their behavior at a physiological salt concentration. For the 20 kDa series, we observed a very clear correlation between the hydrodynamic diameter and the charge density that span throughout the series (see Supplemental Figure A-0-4 for detailed aggregation kinetics).

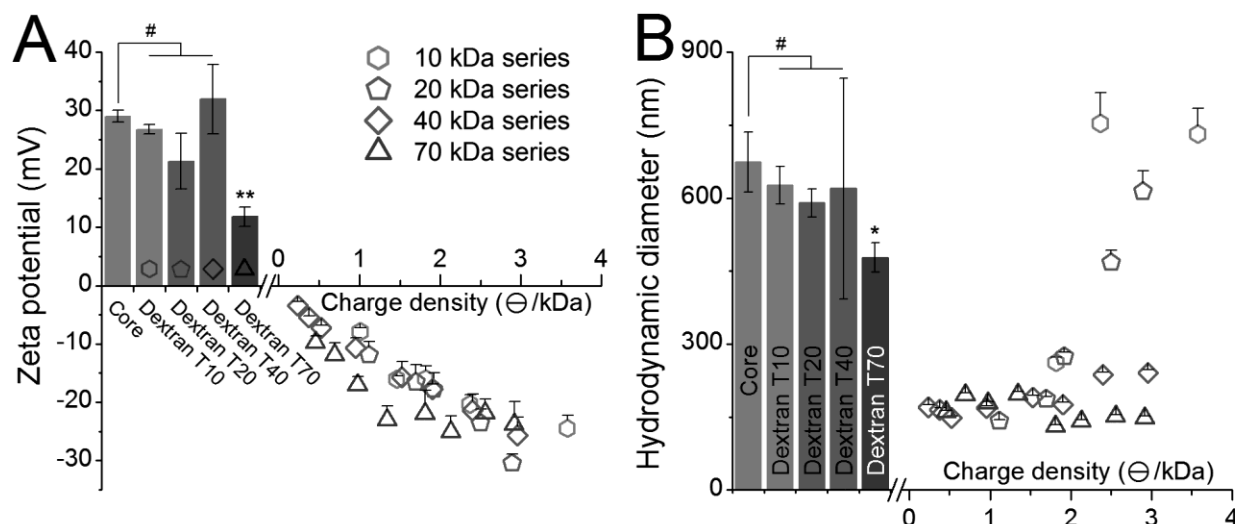


Figure 5-6 : Influence of the charge density of CMD on the colloidal properties of polyplexes. The zeta potential (A) was collected by DLS on fresh polyplexes after 30 min in complexation buffer. The hydrodynamic diameter (B) was averaged from data collected from 10 to 15 min after the addition of PBS. Bars represent control core polyplexes alone or in presence of pristine dextran. Note that no measurement was possible for CMD10-10 and CMD10-20, for coated polyplexes aggregated in complexation buffer even before the addition of PBS. Panel D illustrates the need for an adequate charge density for CMD at a given molecular weight to yield both steric and lateral stabilization. #: not significantly different at 5% from Core formulation; * and **: significantly different from Core formulation ($p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively).

The two CMDs with the highest charge density of the 40 kDa series did not fully abrogate aggregation, as deduced from corresponding diameters increasing beyond 250 nm. All the other CMDs of the two heavier series yielded polyplexes that remained stable in PBS over the course of the experiment. To summarize, 10 CMDs were found unable to stabilize polyplexes in the presence of physiological PBS, as the resulting coated polyplexes readily aggregated within 15 min in those conditions. Interestingly, for some formulations the average hydrodynamic diameter decreased by 2 to 5 nm/min upon salt addition during the first 15 min (see Supplemental Figure A-0-4). Those results suggested that internal rearrangements of polyplexes occurred within the first 15 min after the suspension medium was modified.

We conjecture that a molecular weight greater than 10 kDa is required for an efficient lateral stabilization of polyplexes in those conditions. Interestingly, even though we observed that

all the CMDs of the 10 kDa series failed that step, CMD10-30 significantly lowered the polyplex growth trend. That result suggests that the influence of the charge density is not trivial: depending on the CMD series, increasing the charge density enhances the stabilization up to a point where too high an increase deteriorates the ability of the CMD coating to stabilize the polyplexes (see scheme Figure 5-6D). Thus we failed to find a simple predictive criterion for the design of a polyplex coating in terms of stability in physiological salt concentrations.

5.2.5.5 Adsorption of plasma proteins

Next, we assessed whether a CMD coating could prevent plasma-triggered opsonization of polyplexes. After a 30-min incubation of polyplexes or controls at 37°C with 2% v/v human plasma and a subsequent centrifugation, proteins that were associated with the polyplex pellet were analyzed by non-denaturing SDS-PAGE. Representative gels are reported Figure 5-7A.

We observed a trend from massive protein adsorption on polyplexes to negative-control levels of protein content for the four CMD series. Our systematic study reveals that the zeta potential is a strong predictive indicator of resistance to plasma protein adsorption on polyplexes. Indeed, our data suggest that a threshold zeta potential of *ca.* -20 mV is required to limit plasma protein adsorption caused by bPEI to less than 10% (see Figure 5-7B). Additionally, in the range that we focused on, the molecular weight of CMD was of no significant influence.

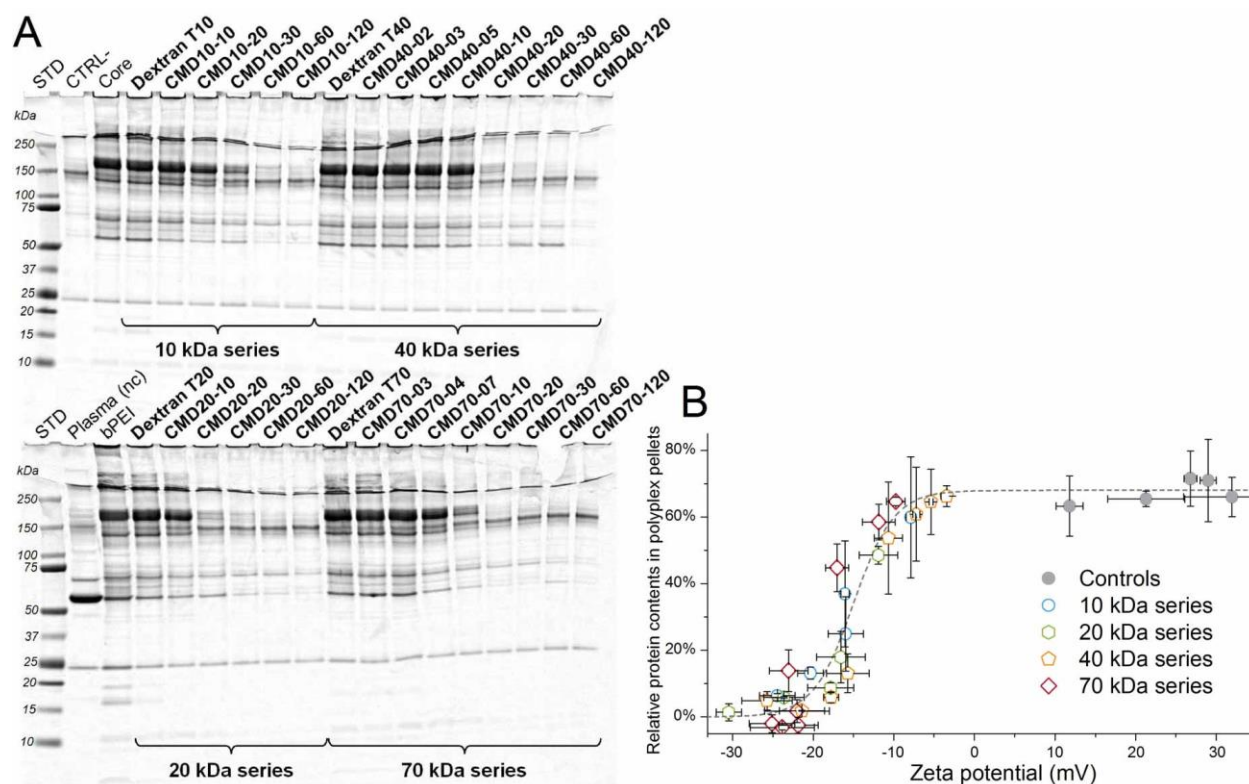


Figure 5-7 : Impact of CMD coating upon opsonization from plasma proteins (A) and its correlation with zeta potential (B). Polyplexes were incubated with 2% v/v plasma from human. Samples were then centrifuged and the pellet was carefully washed and then further dissociated in non-reductive Laemmli sample buffer at 70°C for 10 min. As a non-centrifuged (nc) control, *ca.* 5 μ g of plasma were also analysed (*Plasma (nc)*, bottom gel). Controls that were centrifuged with the samples include 2% v/v plasma from human alone (*CTRL-*, top gel); with core polyplexes (*Core*, top gel); and with bPEI at a concentration equal to the other bPEI-containing samples (*bPEI*, bottom gel). The relative protein content of pellets was plotted against the zeta potential of corresponding polyplexes measured in complexation buffer without plasma. The total protein material that was adsorbed onto sample tubes (*CTRL-*, top gel) was subtracted from the data, which were then normalized to the content of the bPEI-only control (*bPEI*, bottom gel). The dashed line is a guide to the eye that was centered at -15 mV. Error bars represent the standard deviations from two independent replicates.

5.2.5.6 Erythrocytes aggregation assay

Further assays were conducted with biological material. Sheep erythrocytes aggregation assays were performed in order to gain insight into the feasibility of systemic delivery of our coated polyplexes (Boeckle et al., 2004). The microscopic aggregation index (MAI) of each formulation was computed from image analysis. Results are reported in Figure 5-8. Comprehensive micrographs are reported in Supplemental Figure A-0-5. Similarly to the adsorption of plasma proteins, a clear correlation of the MAI with the zeta potential was observed, although preventing erythrocytes aggregation seemed to be less demanding than opsonization. Formulations that yielded an MAI below 10% of the maximum that we measured were considered capable of preventing erythrocyte aggregation.

5.2.5.7 Uptake and expression profiles upon coating and targeting

We chose to perform all our cell-based assays in medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), to set the pDNA concentration at $0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ for transfection, and to wash the polyplexes from the cells at 4 hpt to better mimic *in vivo* conditions, as it had been repeatedly advised (van Gaal et al., 2011; Whitehead et al., 2012; Yousefi et al., 2013). Upon medium replacement at 4 hpt, we added fresh complete medium supplemented with free bPEI at a virtual N:P ratio of 24:1 in each well. That amount of polycation was found to significantly rescue polyplexes from endolysosomal entrapment without causing prohibitive cytotoxicity (data not shown), similarly to previous works (Fortier et al., 2013). We resorted to that measure in order to compensate for the poor endosomal escape that had been previously associated both with polyplexes at low N:P ratios such as 6:1 (Fortier et al., 2013; Thibault et al., 2011) and with dextran-containing nanocarriers (Raemdonck et al., 2009).

As illustrated on Figure 5-9, coated polyplexes could attach to and enter cells very efficiently, up to the same performances of core polyplexes. The natural proclivity of dextran for endocytosis (Wilhelm et al., 2003) arguably explains the overall very efficient uptake of coated polyplexes by A549 cells. Reporter gene expression corresponding to core polyplexes was detectable, yet very low. That result is in line with previous observations made by Ehrhardt *et al.* (Ehrhardt et al., 2006) In their study, they optimized transfection by 25-kDa branched PEI in the presence of 10% serum for 8 different cell lines, including A549 which they unexpectedly failed

to transfect. Using such a setup provided us with a wide dynamic range to probe our CMD library for an increase in transient gene expression.

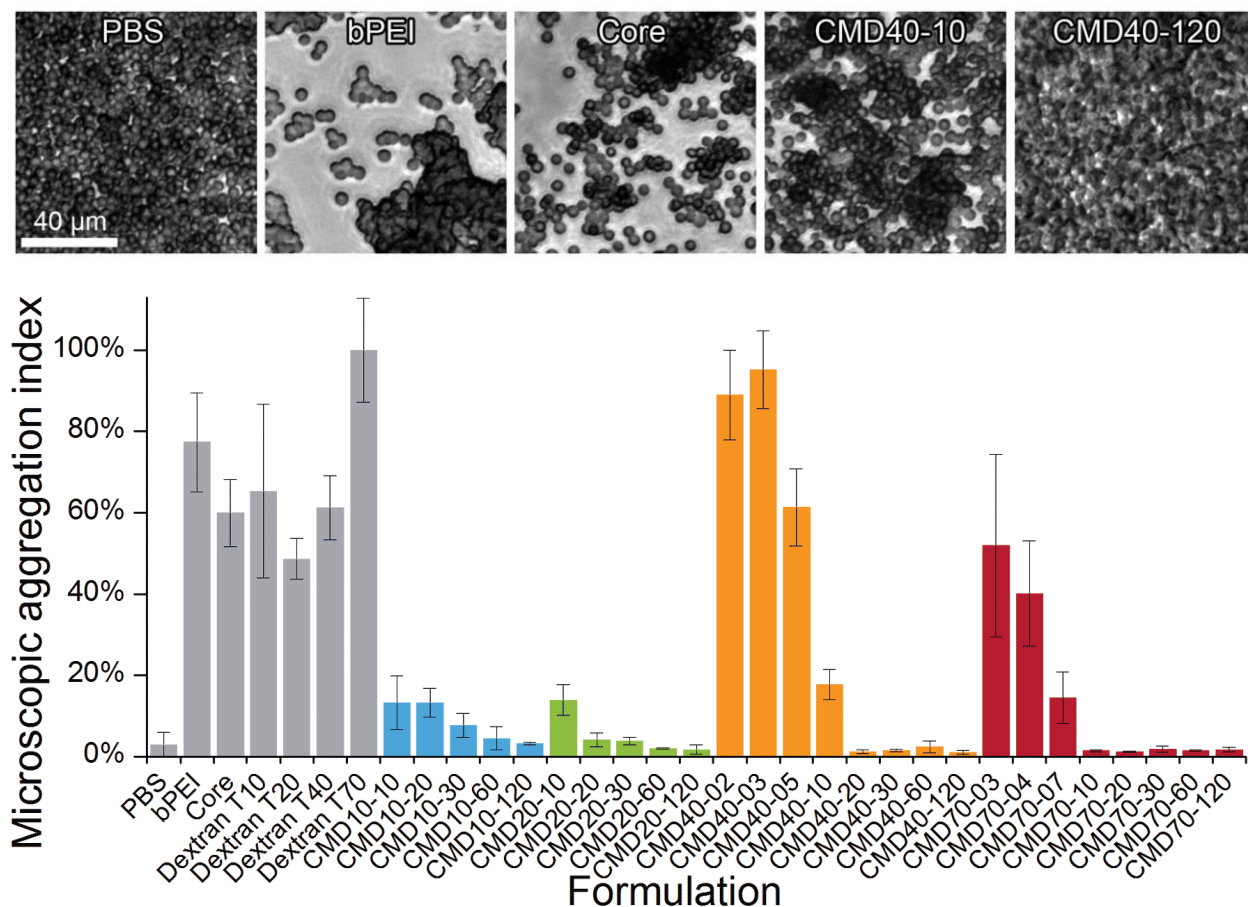


Figure 5-8 : Erythrocyte aggregation assay. Microscopic aggregation index (MAI) relative to the Dextran T70 formulation. Error bars represent the standard deviation of MAI computed from 3 randomly acquired $270\ \mu\text{m} \times 360\ \mu\text{m}$ images from each well. Upper $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ insets illustrate the representative aggregation behavior corresponding to selected formulations, from left to right: PBS, bPEI, Core, CMD40-10, and CMD40-120. Error bars represent the standard deviations from two independent replicates.

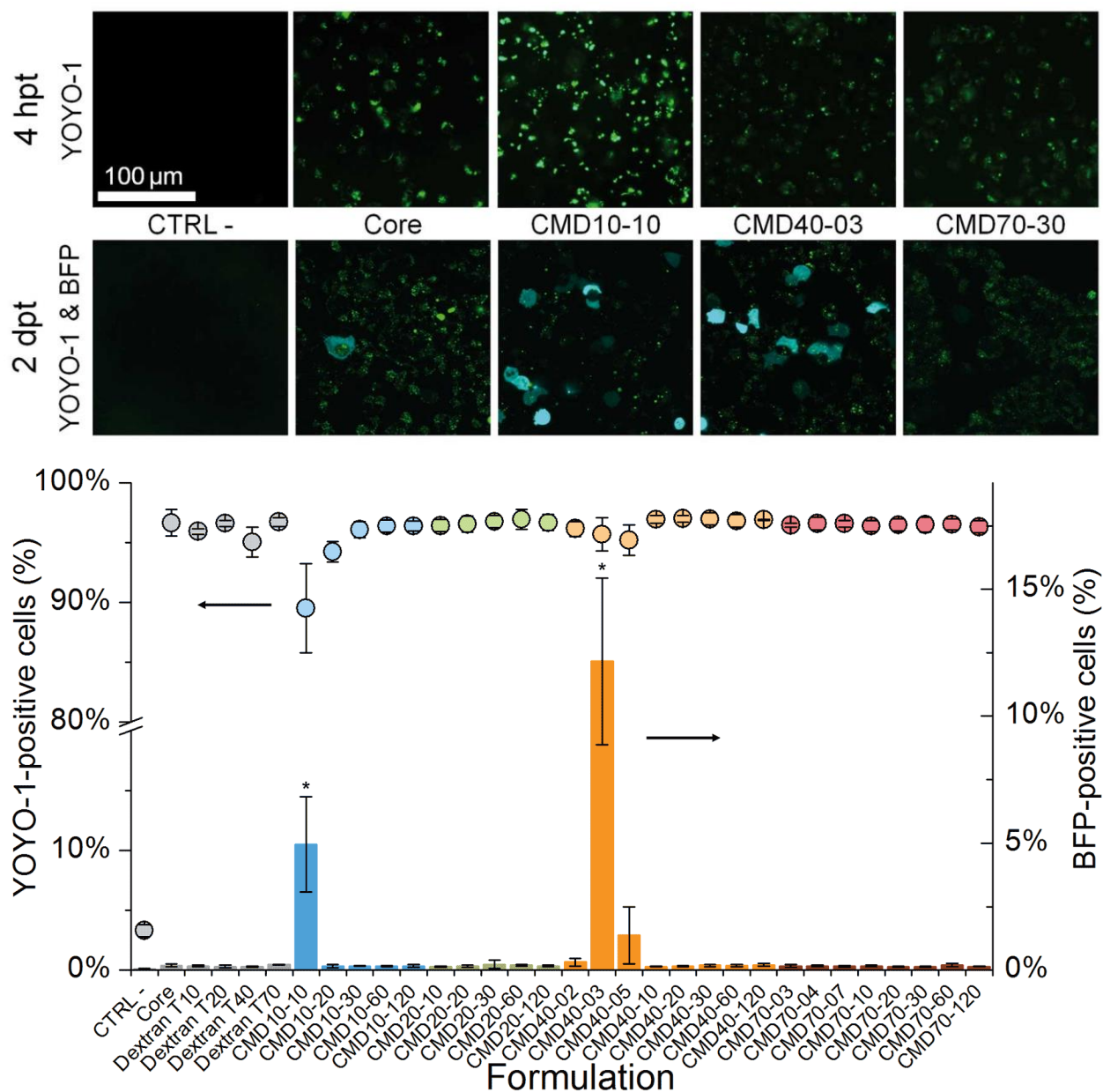


Figure 5-9 : Transfection performances of coated polyplexes on A549 cells. Polyplexes were formed with YOYO-1-stained pDNA coding for BFP. Cytometry measurements were performed at 2 dpt: YOYO-1-positive cells (circles, left axis); BFP-positive cells (columns, right axis). Upper 200 μm × 200 μm insets illustrate selected formulations, from left to right: CTRL- (free YOYO-1-stained pDNA coding for BFP), Core, CMD10-10, CMD40-03, and CMD70-30.

The results corresponding to the entire CMD library (Figure 5-9) indicate that the zeta potential that we measured in our complexation buffer is neither predictive of cellular attachment/uptake, nor is it for reporter gene expression. Rather, two other characteristics of polyplexes were found to impact slightly on cellular uptake and strongly on reporter gene expression. First, the strong aggregation of polyplexes coated with CMD10-10 that was observed in complexation buffer caused the suspension to flocculate into micrometric particles. Those aggregates settled much quicker than nanoparticles in culture medium, forcing interactions with the adherent cells at the bottom of the wells. That mechanism – which is clearly irrelevant to systemic delivery – had already been pointed out as a bias of *in vitro* transfection assays (Ogris et al., 1998; van Gaal et al., 2011). Second, the entrapment tightness of pDNA within polyplexes – as probed by challenging our formulations with DNase I (Figure 5-5) – turned out to be a critical feature that increased reporter gene expression from the very low *ca.* 0.2% of core polyplexes up to *ca.* 12% upon coating with CMD40-03. Almalik *et al.* also recently observed a similar correlation for their chitosan-based nanocarrier coated with a 360-kDa hyaluronic acid, which has a charge density of $2.6 \ominus/\text{kDa}$ (Almalik, Day, & Tirelli, 2013). Taken together, those observations warrant further optimization of the inner cohesion of our polyplexes in synergy with the appropriate electrostatic coating formulations that emerged from our works.

Finally, we equipped one coated polyplex formulation with a coiled-coil tethering system to demonstrate the ease of CMD biofunctionalization. This system was based on the Kcoil/Ecoil heterodimer, two complementary peptides designed to strongly and specifically bind to each other. (Tripet et al., 1996) Kcoil peptides were covalently grafted on CMD by means of a thiol-vinylsulfone Michael addition. Recombinant Ecoil-tagged epidermal growth factor (Boucher et al., 2008) (Ecoil-EGF) was then docked to coated polyplexes by auto-assembly in solution. Confocal microscopy performed at 10 mpt and later at 4 hpt illustrates the efficient binding of coated and targeted polyplexes to cells (see Figure 5-10, left panel). Interestingly, our coated polyplexes that were targeted to the EGFR entered cells faster than non-targeted polyplexes did, in good agreement with previously published results (Fortier et al., 2013). Yet, after 4 hours, we observed no further differences in polyplex uptake. These results indicate that our strategy of biofunctionalization was successful, although it did not ultimately impact on overall gene expression.

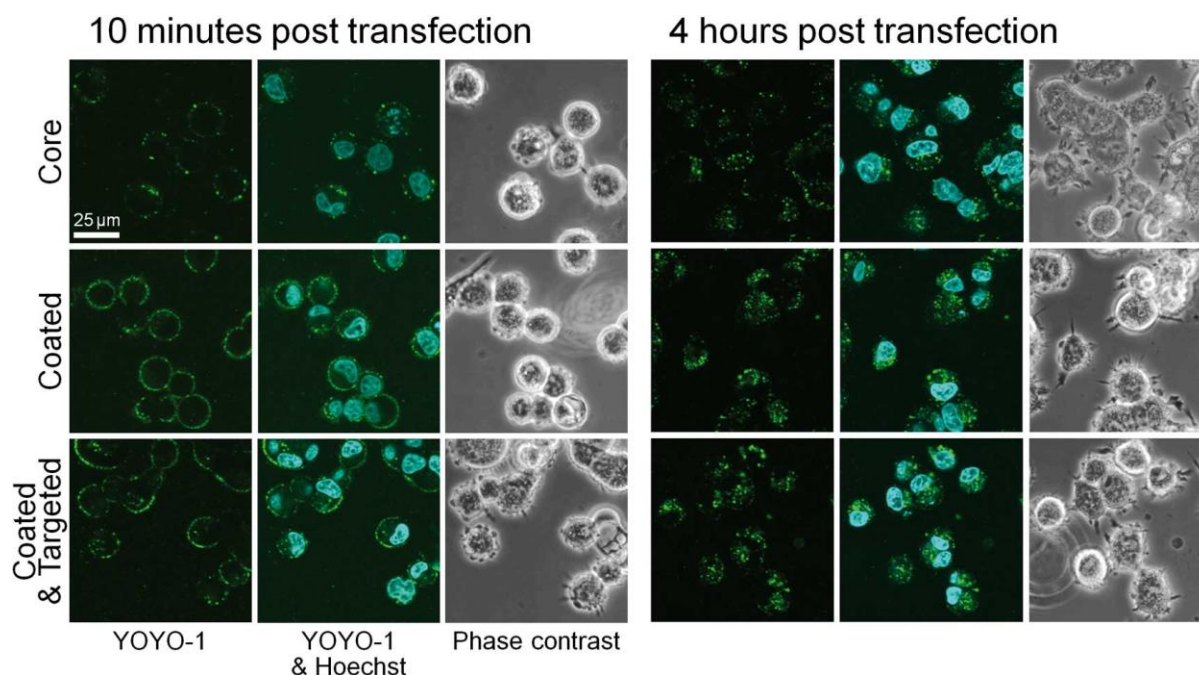


Figure 5-10 : Illustration of polyplex binding to A549 with live confocal microscopy. Three formulations were monitored: Core polyplexes (top line), polyplexes coated with CMD70-30 (middle line), polyplexes coated with CMD70-30-Kcoil and further decorated with Ecoil-EGF at a Kcoil:Ecoil molar ratio of 1:1 and a final Ecoil-EGF concentration of 17 nM (bottom line).

Combined results of our decoupled *in vitro* screening assays are summarized in Table 5-2, where it strikingly appears that a minimum molecular weight of 40 kDa is necessary to provide both salt stability and resistance to plasma. Indeed, for the 20-kDa series, the two only formulations that passed the former criterion were the only two that failed the latter. Four CMD formulations in the upper molecular weights and charge densities successfully validated all criteria. Unexpectedly, three unrelated formulations drastically increased the branched-PEI-based transfection of A549 cells.

5.2.6 Conclusion

We carried out a systematic analysis on a library of 26 closely related polyanions of the CMD family for the surface tailoring of a model polyplex. Results revealed marked correlations between the physicochemical properties of CMD and the behavior of corresponding nanocarriers. Overall, valuable insight was gained into the characteristics of the nanocarrier surface in relation

to cargo pDNA encapsulation and protection, nanocarrier stability in salt, resistance to opsonization in human plasma, and prevention of erythrocyte aggregation: several major issues in systemic delivery.

Table 5-2 : Multi-criteria evaluation of our CMD library for the coating of bPEI/pDNA polyplexes.

^{a,b}: Actual figures are reported in Table 5-1. ^c: Each CMD is considered either to validate the criterion (check), to fail the latter (cross), or to have a moderate impact on it (exclamation mark).

	No Coating	CMD10-10	CMD10-20	CMD10-30	CMD10-60	CMD10-120	CMD20-10	CMD20-20	CMD20-30	CMD20-60	CMD20-120	CMD40-02	CMD40-03	CMD40-05	CMD40-10	CMD40-20	CMD40-30	CMD40-60	CMD40-120	CMD70-03	CMD70-04	CMD70-07	CMD70-10	CMD70-20	CMD70-30	CMD70-60	CMD70-120
Molecular weight ^a																											
Charge density ^b																											
Encapsulation of pDNA ^c	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	!	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	!
Protection of pDNA	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	!	×	!	✓	✓	✓	✓	✓	×	!	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Stability in salt	×	×	×	!	×	×	✓	✓	!	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	!	!	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Resistance to plasma	×	×	×	×	!	✓	×	×	✓	✓	✓	×	×	×	×	!	✓	✓	✓	×	×	×	!	✓	✓	✓	✓
No RBC aggregation	×	!	!	✓	✓	✓	!	✓	✓	✓	✓	×	×	×	!	✓	✓	✓	✓	×	×	!	✓	✓	✓	✓	✓
Attachment/Uptake in A549	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Higher expression in A549	!	✓	!	!	!	!	!	!	!	!	!	!	✓	✓	!	!	!	!	!	!	!	!	!	!	!	!	!

From there, our four topmost CMD candidates thus appear highly relevant for further developments following two different strategies: on the one hand to underlie surface biofunctionalization addressing intracellular trafficking; and on the other hand to tailor the internal cohesion of polyplexes – a framework that is currently being developed in our laboratories.

5.2.7 Associated content

5.2.7.1 Supporting Information

DLS characterization of ghost polyplexes, correlations and details in agarose gel-based assays, detailed aggregation kinetics of coated polyplexes, erythrocyte aggregation assay images, and HPLC quantification of biofunctionalized CMD.

This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

5.2.8 Author information

5.2.8.1 Corresponding Author

* Correspondence should be sent to gregory.decrescenzo@polymtl.ca.

5.2.8.2 Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

5.2.8.3 Funding Sources

This work was supported by the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (C.F.), the Canada Research Chair on Protein-enhanced Biomaterials, and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (G.D.C.).

5.2.8.4 Notes

The use of PEI for transfection may be covered by existing intellectual property rights, including US Patent 6,013,240, European Patent 0,770,140, and foreign equivalents for which further information may be obtained by contacting licensing@polyplus-transfection.com.

This is NRC publication #53291

5.2.9 Acknowledgment

We would like to thank B. Liberelle for setting up the carboxymethylation protocols, S. Bilodeau for NMR measurements, L. Bisson for carrying out HPLC, M. Nelea for performing SEM imaging, and S. Noël for her insightful comments.

5.2.10 References

Almalik, A., Day, P. J., & Tirelli, N. (2013). HA-Coated Chitosan Nanoparticles for CD44-Mediated Nucleic Acid Delivery. *Macromol. Biosci.*, 13(12), 1671-1680. doi: 10.1002/mabi.201300302

Amoozgar, Z., & Yeo, Y. (2012). Recent advances in stealth coating of nanoparticle drug delivery systems. *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.*, 4(2), 219-233. doi: 10.1002/wnan.1157

Boeckle, S., von Gersdorff, K., van der Piepen, S., Culmsee, C., Wagner, E., & Ogris, M. (2004). Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer. *J. Gene Med.*, 6(10), 1102-1111. doi: 10.1002/jgm.598

Boucher, C., St-Laurent, G., Loignon, M., Jolicoeur, M., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2008). The Bioactivity and Receptor Affinity of Recombinant Tagged EGF Designed for Tissue Engineering Applications Is Defined by the Nature and Position of the Tags. *Tissue Eng.*, 14(12), 2069-2077. doi: 10.1089/ten.tea.2008.0037

Buschmann, M. D., Merzouki, A., Lavertu, M., Thibault, M., Jean, M., & Darras, V. (2013). Chitosans for delivery of nucleic acids. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 65(9), 1234-1270. doi: 10.1016/j.addr.2013.07.005

Chang, R. L. S., Crawford, M. P., & West, M. D. (1980). An assessment of the potential use of anionic dextrans as a plasma substitute. *J. Biomed. Engng.*, 2(1), 41-44. doi: 10.1016/0141-5425(80)90090-4

De Crescenzo, G., Litowski, J. R., Hodges, R. S., & O'Connor-McCourt, M. D. (2003). Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de Novo Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding. *Biochemistry*, 42 1754-1763. doi: 10.1021/bi0268450

Durocher, Y., Perret, S., & Kamen, A. (2002). High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res.*, 30(2), E9. doi: 10.1093/nar/30.2.e9

Ehrhardt, C., Schmolke, M., Matzke, A., Knoblauch, A., Will, C., Wixler, V., & Ludwig, S. (2006). Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent. *Signal Transduction*, 6(3), 179-184. doi: 10.1002/sita.200500073

Fortier, C., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2013). A versatile coiled-coil tethering system for the oriented display of ligands on nanocarriers for targeted gene delivery. *Biomaterials*, 34(4), 1344-1353. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.047

Fortier, C., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2014). Surface modification of non-viral nanocarriers for enhanced gene delivery. *Nanomedicine*, 9(1), 135-151. doi: 10.2217/nnm.13.194

Grayson, A. C., Doody, A. M., & Putnam, D. (2006). Biophysical and structural characterization of polyethylenimine-mediated siRNA delivery in vitro. *Pharm. Res.*, 23(8), 1868-1876. doi: 10.1007/s11095-006-9009-2

Heinze, T., Liebert, T., Heublein, B., & Hornig, S. (2006). Functional Polymers Based on Dextran. Dans D. Klemm (Édit.), *Polysaccharides II* (vol. 205, p. 199-291): Springer Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/12_100

Hornof, M., de la Fuente, M., Hallikainen, M., Tammi, R. H., & Urtti, A. (2008). Low molecular weight hyaluronan shielding of DNA/PEI polyplexes facilitates CD44 receptor mediated uptake in human corneal epithelial cells. *J. Gene Med.*, 10(1), 70-80. doi: 10.1002/jgm.1125

Jiang, D., & Salem, A. K. (2012). Optimized dextran–polyethylenimine conjugates are efficient non-viral vectors with reduced cytotoxicity when used in serum containing environments. *Int. J. Pharm.*, 427(1), 71-79. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.10.032

Kickhoefer, V. A., Han, M., Raval-Fernandes, S., Poderycki, M. J., Moniz, R. J., Vaccari, D., . . . Rome, L. H. (2008). Targeting Vault Nanoparticles to Specific Cell Surface Receptors. *ACS Nano*, 3(1), 27-36. doi: 10.1021/nn800638x

Kim, I.-Y., Kang, Y.-S., Lee, D. S., Park, H.-J., Choi, E.-K., Oh, Y.-K., . . . Kim, J., -S. (2009). Antitumor activity of EGFR targeted pH-sensitive immunoliposomes encapsulating gemcitabine in A549 xenograft nude mice. *J. Control. Release*, 140(1), 55-60. doi: 10.1016/j.jconrel.2009.07.005

Kim, J. S., Oh, M. H., Park, J. Y., Park, T. G., & Nam, Y. S. (2013). Protein-resistant, reductively dissociable polyplexes for in vivo systemic delivery and tumor-targeting of siRNA. *Biomaterials*, 34(9), 2370-2379. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.12.004

Krentsel, L., Chaubet, F., Rebrov, A., Champion, J., Ermakov, I., Bittoun, P., . . . Jozefonvicz, J. (1997). Anticoagulant activity of functionalized dextrans. Structure analyses of carboxymethylated dextran and first Monte Carlo simulations. *Carbohydr. Polym.*, 33(1), 63-71. doi: 10.1016/S0144-8617(96)00173-7

Laga, R., Carlisle, R., Tangney, M., Ulbrich, K., & Seymour, L. W. (2012). Polymer coatings for delivery of nucleic acid therapeutics. *J. Control. Release*, 161(2), 537-553. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.02.013

Liberelle, B., Merzouki, A., & De Crescenzo, G. (2013). Immobilized carboxymethylated dextran coatings for enhanced ELISA. *J. Immunol. Methods*, 389(1–2), 38–44. doi: 10.1016/j.jim.2012.12.007

Lungwitz, U., Breunig, M., Blunk, T., & Gopferich, A. (2005). Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 60(2), 247–266. doi: 10.1016/j.ejpb.2004.11.011

Martens, T. F., Remaut, K., Deschout, H., Engbersen, J. F. J., Hennink, W. E., van Steenberghe, M. J., . . . Braeckmans, K. (2015). Coating nanocarriers with hyaluronic acid facilitates intravitreal drug delivery for retinal gene therapy. *J. Controlled Release*, 202(0), 83–92. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.01.030

Miyajima, T., Yoshida, K., & Högfeltdt, E. (1993). Polyelectrolyte Titrations. The System Na^+/H^+ on Carboxymethyl dextran. *J. Colloid Interface Sci.*, 156(2), 383–387. doi: 10.1006/jcis.1993.1126

Mizrahy, S., & Peer, D. (2012). Polysaccharides as building blocks for nanotherapeutics. *Chem. Soc. Rev.*, 41(7), 2623–2640. doi: 10.1039/c1cs15239d

Mizrahy, S., Raz, S. R., Hasgaard, M., Liu, H., Soffer-Tsur, N., Cohen, K., . . . Peer, D. (2011). Hyaluronan-coated nanoparticles: The influence of the molecular weight on CD44-hyaluronan interactions and on the immune response. *J. Control. Release*, 156(2), 231–238. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.06.031

Moore, A., Weissleder, R., & Bogdanov, A., Jr. (1997). Uptake of dextran-coated monocrystalline iron oxides in tumor cells and macrophages. *J. Magn. Reson. Imaging*, 7(6), 1140–1145. doi: 10.1002/jmri.1880070629

Niebel, Y., Buschmann, M. D., Lavertu, M., & De Crescenzo, G. (2014). Combined Analysis of Polycation/ODN Polyplexes by Analytical Ultracentrifugation and Dynamic Light Scattering Reveals their Size, Refractive Index Increment, Stoichiometry, Porosity, and Molecular Weight. *Biomacromolecules*, 15(3), 940–947. doi: 10.1021/bm4018148

Ning, S., Huang, Q., Sun, X., Li, C., Zhang, Y., Li, J., & Liu, Y. (2011). Carboxymethyl dextran-coated liposomes: Toward a robust drug delivery platform. *Soft Matter*, 7(19), 9394–9401. doi: 10.1039/C1SM05814B

Ogris, M., Steinlein, P., Kursa, M., Mechtler, K., Kircheis, R., & Wagner, E. (1998). The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther.*, 5(10), 1425-1433. doi: 10.1038/sj.gt.3300745

Raemdonck, K., Martens, T. F., Braeckmans, K., Demeester, J., & De Smedt, S. C. (2013). Polysaccharide-based nucleic acid nanoformulations. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 65(9), 1123-1147. doi: 10.1016/j.addr.2013.05.002

Raemdonck, K., Naeye, B., Buyens, K., Vandenbroucke, R. E., Høgset, A., Demeester, J., & De Smedt, S. C. (2009). Biodegradable Dextran Nanogels for RNA Interference: Focusing on Endosomal Escape and Intracellular siRNA Delivery. *Adv. Funct. Mater.*, 19(9), 1406-1415. doi: 10.1002/adfm.200801795

Sawant, R. R., Sriraman, S. K., Navarro, G., Biswas, S., Dalvi, R. A., & Torchilin, V. P. (2012). Polyethyleneimine-lipid conjugate-based pH-sensitive micellar carrier for gene delivery. *Biomaterials*, 33(15), 3942-3951. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.11.088

Schaffert, D., Kiss, M., Rodl, W., Shir, A., Levitzki, A., Ogris, M., & Wagner, E. (2011). Poly(I:C)-Mediated Tumor Growth Suppression in EGF-Receptor Overexpressing Tumors Using EGF-Polyethylene Glycol-Linear Polyethylenimine as Carrier. *Pharm. Res.*, 28(4), 731-741. doi: 10.1007/s11095-010-0225-4

Schwalbe, M., Buske, N., Vetterlein, M., Höffken, K., Pachmann, K., & Clement, J. H. (2006). The Carboxymethyl Dextran Shell is an Important Modulator of Magnetic Nanoparticle Uptake in Human Cells. *Z. Phys. Chem.*, 220(1_2006), 125-131. doi: 10.1524/zpch.2006.220.1.125

Sun, Y. X., Zhang, X. Z., Cheng, H., Cheng, S. X., & Zhuo, R. X. (2008). A low-toxic and efficient gene vector: carboxymethyl dextran-graft-polyethylenimine. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 84(4), 1102-1110. doi: 10.1002/jbm.a.31520

Thibault, M., Astolfi, M., Tran-Khanh, N., Lavertu, M., Darras, V., Merzouki, A., & Buschmann, M. D. (2011). Excess polycation mediates efficient chitosan-based gene transfer by promoting lysosomal release of the polyplexes. *Biomaterials*, 32(20), 4639-4646. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.03.010

Thibault, M., Nimesh, S., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2010). Intracellular trafficking and decondensation kinetics of chitosan-pDNA polyplexes. *Mol. Ther.*, 18(10), 1787-1795. doi: 10.1038/mt.2010.143

Tripet, B., Yu, L., Bautista, D. L., Wong, W. Y., Irvin, R. T., & Hodges, R. S. (1996). Engineering a de novo-designed coiled-coil heterodimerization domain for the rapid detection, purification and characterization of recombinantly expressed peptides and proteins. *Protein Eng.*, 9(11), 1029-1042. doi: 10.1093/protein/9.11.1029

Trubetskoy, V. S., Wong, S. C., Subbotin, V., Budker, V. G., Loomis, A., Hagstrom, J. E., & Wolff, J. A. (2003). Recharging cationic DNA complexes with highly charged polyanions for in vitro and in vivo gene delivery. *Gene Ther.*, 10(3), 261-271. doi: 10.1038/sj.gt.3301888

van Gaal, E. V. B., van Eijk, R., Oosting, R. S., Kok, R. J., Hennink, W. E., Crommelin, D. J. A., & Mastrobattista, E. (2011). How to screen non-viral gene delivery systems in vitro? *J. Control. Release*, 154(3), 218-232. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.05.001

Whitehead, K. A., Matthews, J., Chang, P. p. H., Niroui, F., Dorkin, J. R., Severgnini, M., & Anderson, D. G. (2012). In Vitro–In Vivo Translation of Lipid Nanoparticles for Hepatocellular siRNA Delivery. *ACS Nano*, 6(8), 6922-6929. doi: 10.1021/nn301922x

Wightman, L., Kircheis, R., Rossler, V., Carotta, S., Ruzicka, R., Kurs, M., & Wagner, E. (2001). Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J. Gene Med.*, 3(4), 362-372. doi: 10.1002/jgm.187

Wilhelm, C., Billotey, C., Roger, J., Pons, J. N., Bacri, J. C., & Gazeau, F. (2003). Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials*, 24(6), 1001-1011. doi: 10.1016/S0142-9612(02)00440-4

Wotschadlo, J., Liebert, T., Heinze, T., Wagner, K., Schnabelrauch, M., Dutz, S., . . . Clement, J. H. (2009). Magnetic nanoparticles coated with carboxymethylated polysaccharide shells—Interaction with human cells. *J. Magn. Magn. Mater.*, 321(10), 1469-1473. doi: 10.1016/j.jmmm.2009.02.069

Yin, H., Kanasty, R. L., Eltoukhy, A. A., Vegas, A. J., Dorkin, J. R., & Anderson, D. G. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.*, 15(8), 541-555. doi: 10.1038/nrg3763

Yousefi, A., Storm, G., Schiffelers, R., & Mastrobattista, E. (2013). Trends in polymeric delivery of nucleic acids to tumors. *J. Control. Release*, 170(2), 209-218. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.05.040

Yu, Y., & Chau, Y. (2012). One-step "click" method for generating vinyl sulfone groups on hydroxyl-containing water-soluble polymers. *Biomacromolecules*, 13(3), 937-942. doi: 10.1021/bm2014476

CHAPITRE 6 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

6.1 Conjugués dextrane-peptides

6.1.1 Objectif

Le PEI a été systématiquement utilisé comme agent de condensation de l'ADN au long de ces travaux. Cela se justifie de par de nombreux aspects : nous avons pu travailler avec une nanoparticule modèle simple, économique et d'efficacité adéquate (aux bons résultats de base et possédant une marge de progression). Cela étant dit, le PEI n'est pas sans défauts, il est en particulier toxique et non biodégradable. Il existe une variété extrêmement large d'agents de transfection alternatifs dans le commerce ainsi qu'en développement. Nombre d'entre eux répond à ces problèmes, moyennant surcoût ou efficacité amoindrie.

Nous avons alors envisagé de concevoir notre propre agent de condensation à partir des constituants et techniques utilisées au cours de ces travaux : le dextrane, la chimie vinylsulfone, et les peptides de synthèse. Avec un tel agent, il serait possible à la fois de former le cœur de la nanoparticule, et d'y implémenter l'immobilisation superhélice EK à des fins propres aux problématiques liées au cœur de la nanoparticule. Nous nous sommes inspirés directement d'un article de Tang *et al.* sorti en mai 2014 dans lequel est décrit un conjugué dextrane-peptide cationique formé au moyen d'une chimie similaire au vinylsulfone (Tang et al., 2014). Dans cette étude, les auteurs ont préparé cinq conjugués de dextrane avec le peptide cationique R5H5 – cinq arginines pour la condensation de l'ADNp, et cinq histidines pour l'échappement endosomal, – puis ont mené des tests basiques de transfection et de toxicité *in vitro*.

6.1.2 Résultats

6.1.2.1 Dextrane-vinylsulfone

Nous avons mis en place une méthode de préparation de dextrane fonctionnalisé avec du divinylsulfone en adaptant la méthode décrite par Yu et Chau (Yu & Chau, 2012). Une chimiothèque de dextrans vinylsulfones (Dextrane-VS) a été préparée afin de doter le groupe de

recherche de polymères fonctionnalisés prêts à l'emploi. Le protocole détaillé est reporté en Annexe C.

Pour l'application dont il est question ici, nous avons sélectionné le dextran T10 comme base, et visé un degré de fonctionnalisation de 40%. C'est en effet la structure la plus performante que Tang et al. avaient mise en évidence dans leur étude de dextrane-peptide cationique (10-40 kDa-% parmi 10-20 ; 10-40 ; 20-10 ; 20-20 ; 70-10) (Tang et al., 2014). Sur cette base, nous avons choisi de tester le greffage similaire du peptide R5H5, ainsi qu'un mélange de peptides : R5H5 et Kcoil. Notre hypothèse est que les R5H5 ainsi qu'une partie des Kcoils vont permettre de former un polyplexe avec de l'ADNp, et que les Kcoil disponibles vont permettre d'équiper le polyplexe de biomolécules étiquetées avec le Ecoil.

Notons ici que nous avons observé une interaction assez forte entre le peptide Kcoil et l'ADN, de par la nature cationique de ce peptide ainsi que sa conformation en hélice alpha présentant une face hydrophobe (voir Figure 6-1). Ces caractéristiques ont en effet été identifiées comme favorables à une interaction entre un peptide et le sillon majeur de l'ADN (Niidome et al., 1997; Suzuki & Gerstein, 1995).

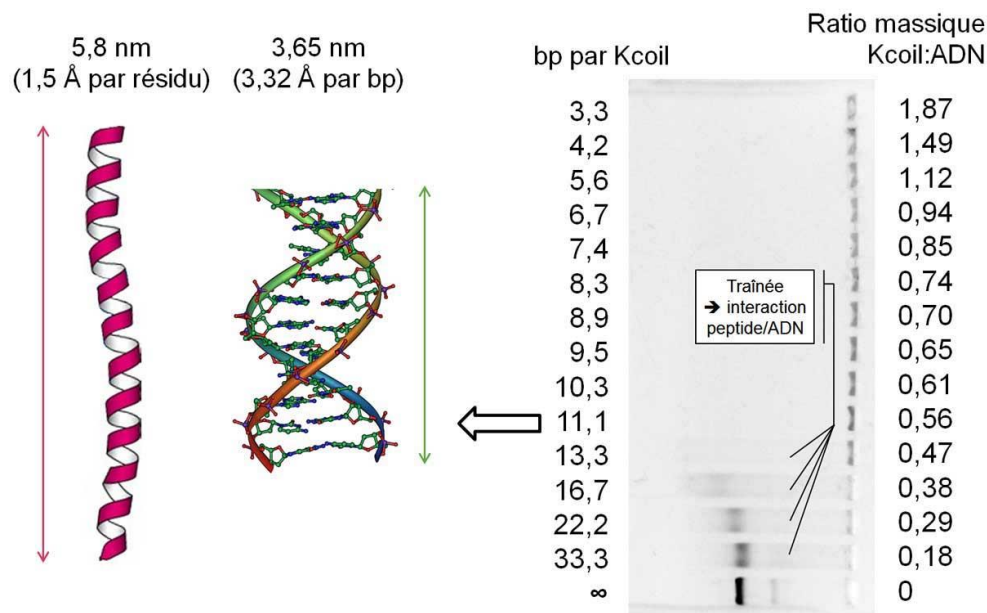


Figure 6-1 : L'interaction entre l'ADN et le peptide Kcoil. Gel d'agarose représentatif de mélanges Kcoil/ADNp. Visualisation de 11.1 paires de bases vis-à-vis d'un Kcoil en conformation hélice alpha représenté en ruban. Cette situation correspond au premier puits dans lequel tout l'ADN est resté dans le puits

Après d'infructueux essais de formation de polyplexes à partir de peptides Kcoil seuls, nous nous sommes donc tournés vers une architecture hybride contenant à la fois du Kcoil et un peptide cationique de complément afin de former des polyplexes (voir Schéma 6-1).

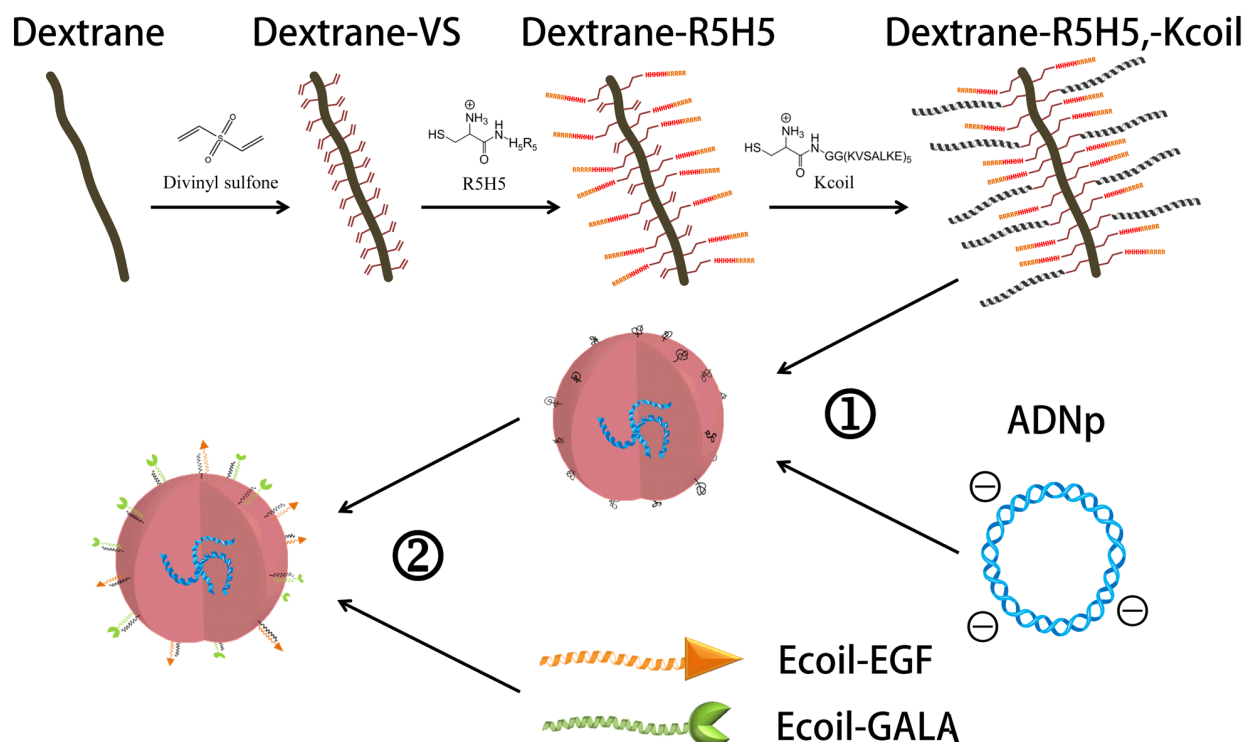


Schéma 6-1 : Principe de formation de polyplexes à partir d'un hybride dextrane-peptides.

6.1.2.2 Synthèse des conjugués

Nous avons d'abord préparé un dextrane fonctionnalisé avec le DVS, dont la quantification RMN- ^1H a indiqué un degré de modification d_{CM} de 39.6%. À partir de ce **Dextrane-VS**, nous avons préparé un conjugué **Dextrane-R5H5**, ainsi qu'un conjugué **Dextrane-R5H5,-Kcoil**. Les vinylsulfones ont réagi quantitativement avec les thiols portés par l'unique cystéine présente sur chaque peptide. Les spectres RMN- ^1H de ces espèces sont rapportées **Figure 6-2**. La quantification du Dextrane-R5H5,-Kcoil indique un degré de modification par R5H5 et Kcoil d'environ 25% et 15% respectivement.

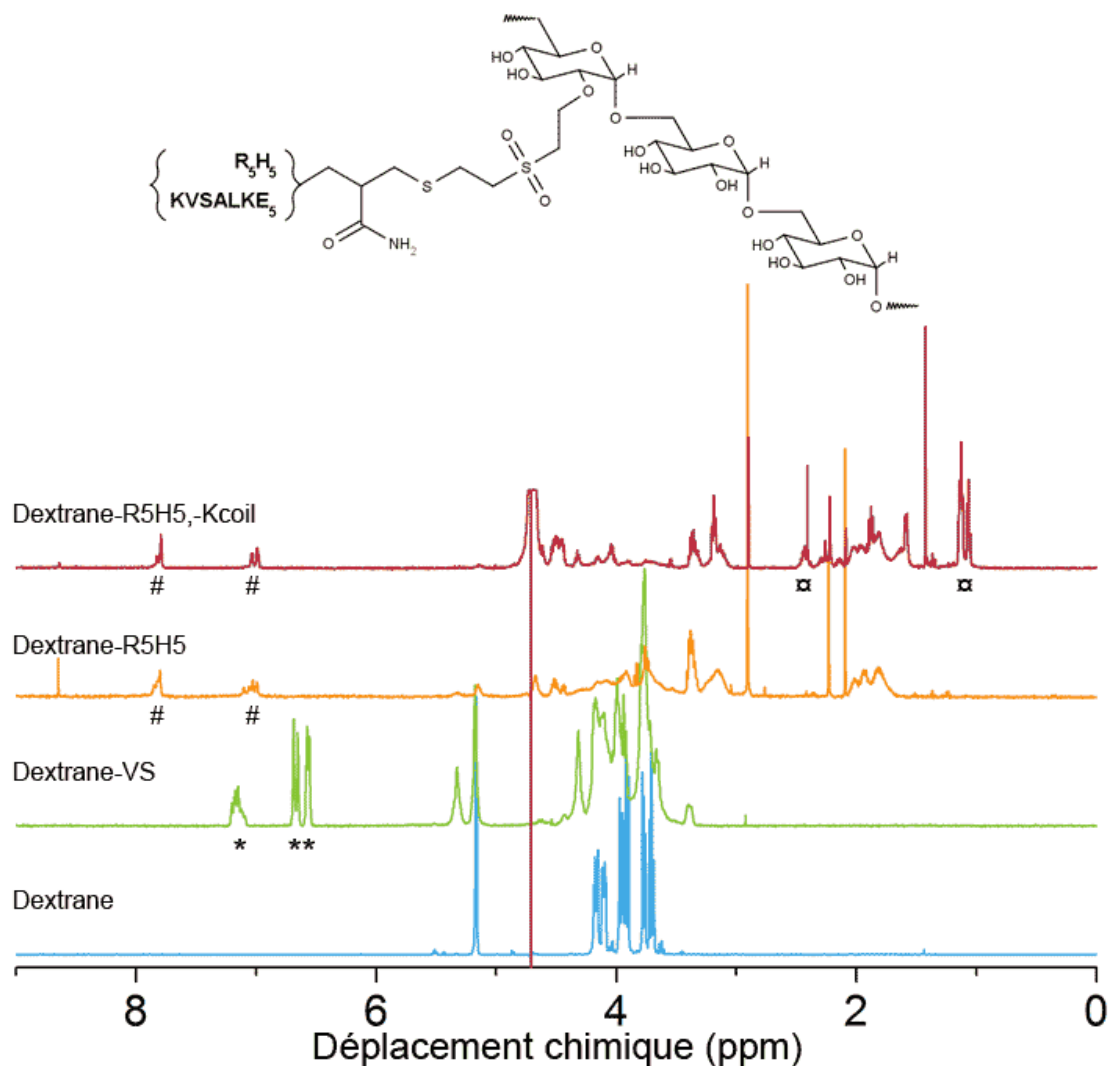


Figure 6-2 : Caractérisation RMN- ^1H du dextrane et des conjugués préparés. Les symboles indiquent quels pics ont été utilisés pour la quantification des degrés de modification : pics spécifiques au vinylsulfone (*) ; aux histidines du R5H5 (#) ; et aux lysines du Kcoil (⌘).

6.1.2.3 Caractérisation des nanoparticules

Nous avons vérifié que le Dextrane-R5H5 formait bien des nanoparticules lors de sa polyplexation avec l'ADNp, voir **Figure 6-3**. Le rapport N:P 12:1 a été retenu comme compromis entre une valeur pas trop élevée afin de minimiser l'excès de polycation en solution, et les valeurs assez élevées courantes dans la littérature, et en particulier un N:P de 20:1 comme rapport optimal pour le conjugué similaire au nôtre (Tang et al., 2014).

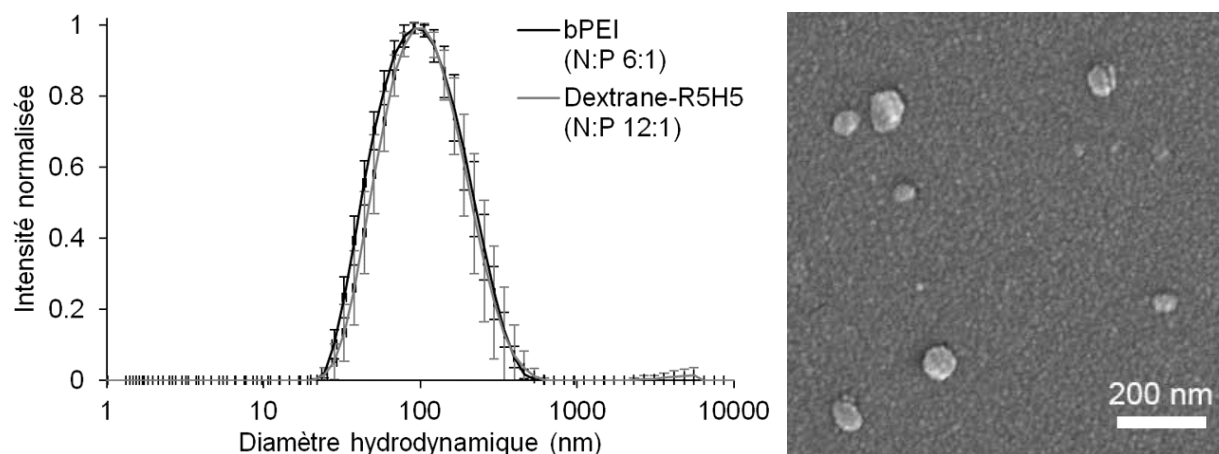


Figure 6-3 : Caractérisation physique des polyplexes Dextrane-R5H5/ADNp. DLS ($n \times N = 3 \times 2$) (gauche) et microscopie électronique ($1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$) (droite).

Nous avons également testé la protection contre la DNase I, en utilisant une gamme d'activités de cette nucléase pour bien comparer les formulations entre elles, voir **Figure 6-4**. Les résultats indiquent clairement que le peptide seul a apporté une très légère protection, avec seulement 60% d'ADNp protégé à la plus basse activité de DNase I, et moins de 5% ensuite. En revanche, lorsque greffé sur le dextrane, il a apporté une protection au moins aussi bonne que le bPEI à 0.2 unités Kunitz par μg d'ADN, mais cette protection reste néanmoins inférieure à ce dernier pour les plus hautes activités de DNase I. Nous pouvons donc conclure que le Dextrane-R5H5 apporte une protection intermédiaire en le peptide seul et le contrôle positif bPEI.

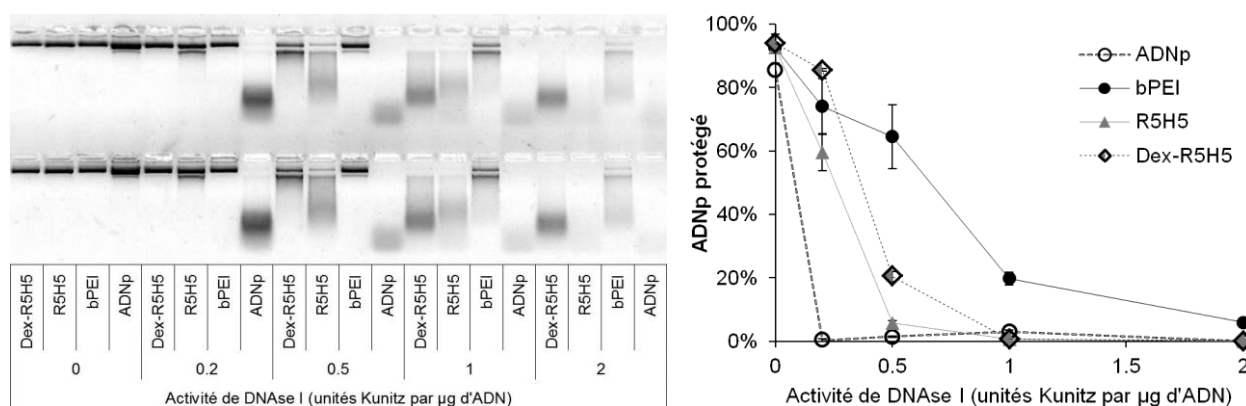


Figure 6-4 : Test de protection contre la DNase I. Gel d'agarose en duplicata (contraste ajusté) (gauche) ; quantification de l'ADN protégé en fonction de l'activité de DNase I.

Nous n'avons pas pu procéder à une caractérisation aussi extensive du Dextrane-R5H5,-Kcoil car nous avons utilisé de très petites quantités préparées avec parcimonie. Un gel d'agarose indiquant la bonne condensation de l'ADNp est reporté **Figure 6-5**.

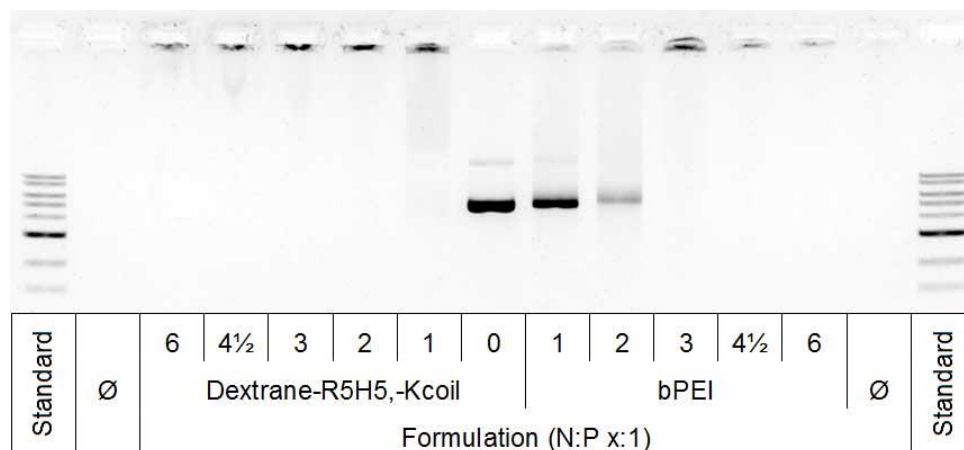


Figure 6-5 : Condensation de l'ADNp par le Dextrane-R5H5,-Kcoil.

Les tests cellulaires que nous avons ensuite menés ont révélé une incapacité de nos conjugués à transfecter efficacement lors de tests préliminaires sur cellules HUVEC comme sur cellules HEK293-6E. Comme nous avons préalablement validé la condensation de l'ADNp par les arginines, nous avons conclu qu'il n'y avait pas suffisamment d'échappement endosomal de nos polyplexes ; un problème qui s'est constamment présenté tout au long de nos travaux. C'est pourquoi ici nous avons développé la protéine chimère formée du peptide Ecoil et du peptide endosomolytique GALA, en vue de la lier aux polyplexes présentant des peptides Kcoil. Toutefois, les tests de transfection de polyplexes équipés du maximum d'Ecoil-GALA théorique n'ont pas révélé d'effet significatif. Ces résultats ne sont pas représentés car seule une observation au microscope a été effectuée afin de conclure sur l'inefficacité des formulations.

La conception et la production d'Ecoil-GALA – réalisées par Élodie Louvier – sont résumées **Figure 6-6**. Remarquons que la masse molaire moléculaire indiquée par l'électrophorèse est presque le double de la masse théorique de la protéine. En outre, deux bandes sont clairement visibles en coloration de Coomassie, et elles restent distinctes en sondant la présence d'étiquette polyhistidine. Il est intéressant de noter que ces deux observations avaient également été faites au sujet d'Ecoil-EGF, sans que les activités de la portion EGF et de la portion Ecoil ne soient affectées (Boucher et al., 2008).

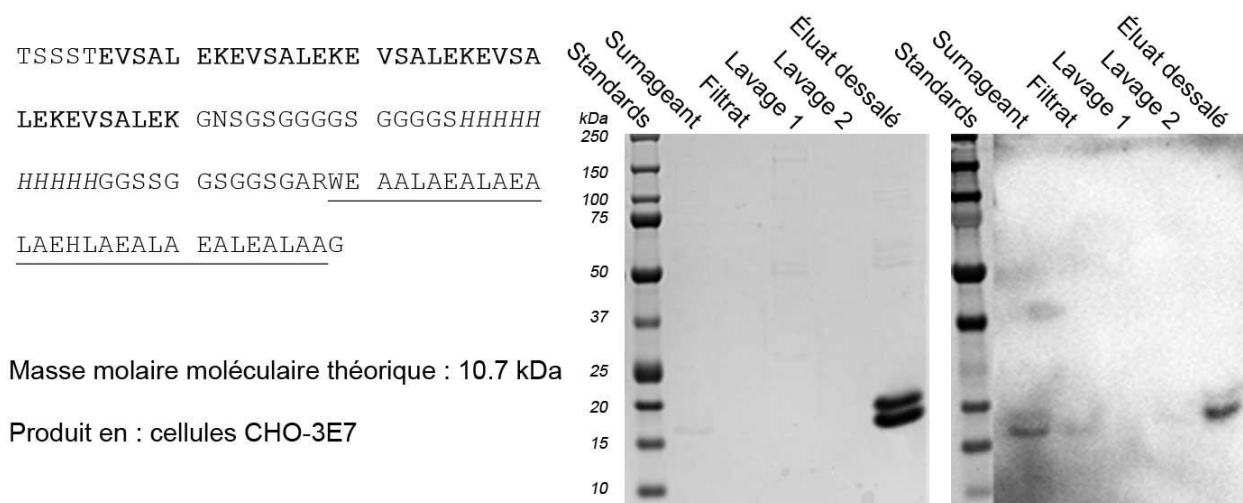


Figure 6-6 : Conception, production et purification de la r-protéine Ecoil-GALA. La séquence de la protéine est incluse : Ecoil (en gras), l'étiquette de purification polyhistidine (en italique) et la séquence GALA (en souligné). Les acides aminés supplémentaires sont des résidus de construction d'autres r-protéines conçues dans le cadre des travaux de Élodie Louvier (Louvier, 2015). Visualisation des échantillons de purification d'Ecoil-GALA en coloration Coomassie (au centre) et en immuno-buvardage de type Western avec un anticorps anti-polyHis-HRP (à droite).

6.1.3 Discussion

Devant le manque de performances de notre agent de transfection, et malgré la préparation réussie d'Ecoil-GALA, nous avons décidé de ne pas approfondir ces travaux, dont l'impact était devenu moindre. Notre Dextrane-R5H5 est en effet très proche en structure du conjugué préparé par Tang *et al.* dont nous nous sommes inspirés. Il ne représente donc pas d'avancée significative ni originale pour la communauté. Les difficultés rencontrées quant au manque de performances d'Ecoil-GALA monté sur des polyplexes à base de Dextrane-R5H5,-Kcoil auraient nécessité un investissement jugé trop risqué à ce stade du doctorat afin de les surmonter. Le peptide Ecoil-GALA ainsi que son vecteur d'expression restent néanmoins disponibles en bonnes quantités pour d'éventuelles applications ultérieures.

6.2 Immunisation de souris avec polyplexes enrobés

There are only three problems in gene therapy: delivery, delivery and delivery.

Dr. Inder M. Verma, 1999 (in *Fixing the gene*, *TIME*, 11 janvier 1999, par Leon Jaroff)

6.2.1 Objectif

L'objectif de ce volet provient d'un besoin exprimé par l'équipe Anticorps monoclonaux, du portefeuille Thérapeutiques en Santé Humaine du CNRC. Les anticorps monoclonaux, comme nous l'avons abordé au Chapitre 1, sont des glycoprotéines issues de la réponse immunitaire d'organismes complexes face à un antigène. La première étape dans le développement d'une thérapie à anticorps monoclonaux est l'obtention d'immunoglobulines capables d'interagir spécifiquement avec l'antigène ciblé, à partir du lymphocyte B qui le sécrète. Présentement, il reste nécessaire d'induire la formation de ces anticorps par un animal (souris, lapin, singe, lama, *etc.*), puis de récolter des lymphocytes B à partir de la rate ou de ganglions lymphatiques (voir Schéma 6-2).

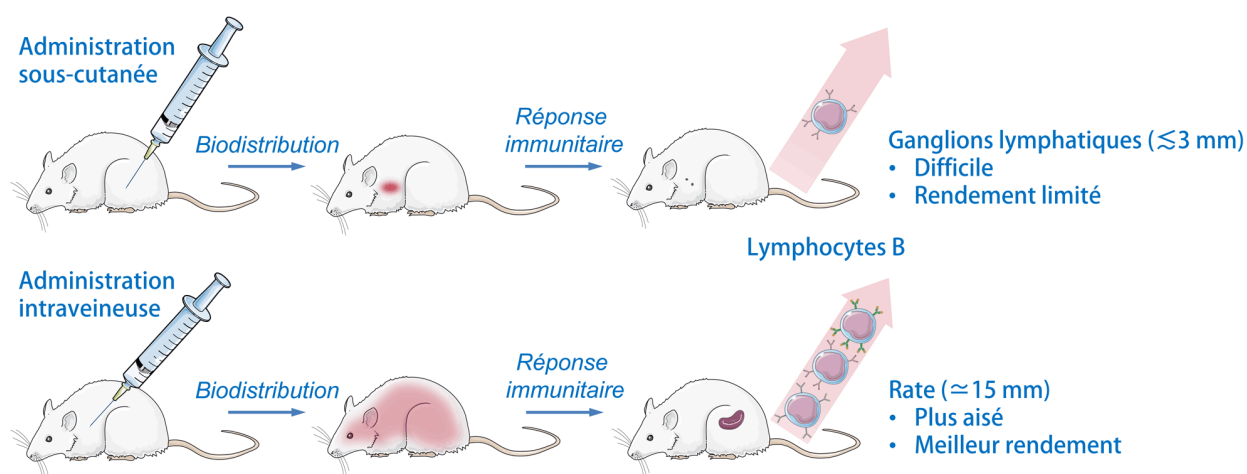


Schéma 6-2 : Avantage de l'injection intraveineuse (systémique) sur la sous-cutanée.

Il est plus aisé de travailler à partir de la rate, organe plus volumineux qu'un ganglion; toutefois pour augmenter la probabilité de présence de lymphocytes B sécréteurs dans la rate il est préférable de procéder à une délivrance de gènes systémique, et non locale dans l'animal (Christine Gadoury, communication personnelle, février 2015). La délivrance de gènes locale reste une stratégie possible, mais limite la récolte à quelques ganglions environnants.

Conceptuellement, il n'est pas nécessaire de viser un type cellulaire en particulier pour cette délivrance de gènes *in vivo*. En effet, pourvu que l'antigène en question soit naturellement reconnu comme un intrus par l'organisme, sa simple production par des cellules transfectées peut déclencher la réponse immunitaire. Cela se fait par le biais de l'absorption de l'antigène par des cellules présentatrices d'antigène comme les cellules dendritiques matures (voir Schéma 6-3).

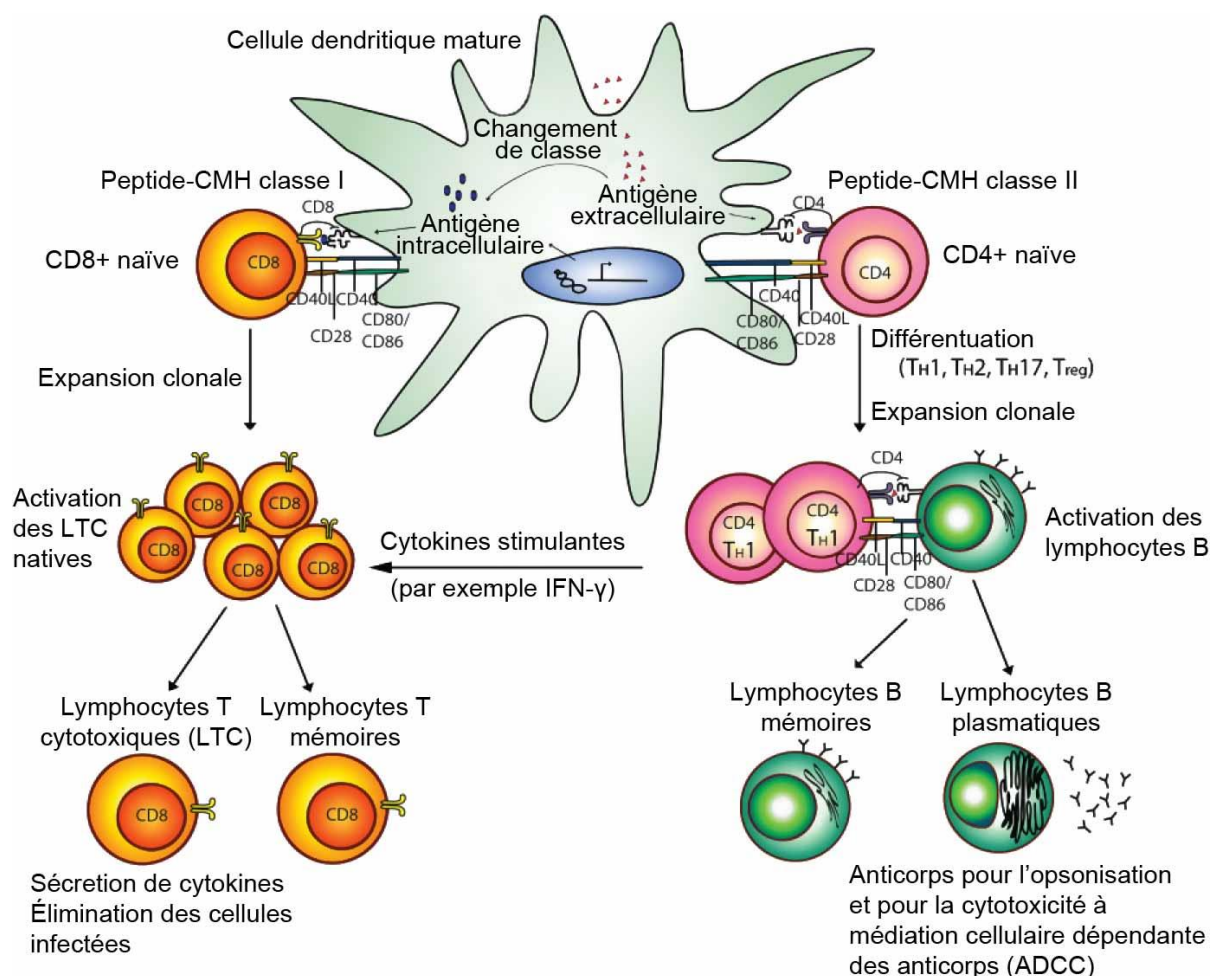


Schéma 6-3 : Aperçu de la réponse immunitaire suite à une immunisation par ADN ayant occasionné la transfection d'une cellule dendritique mature, ou l'endocytose d'antigènes recombinants par cette même cellule dendritique mature. (adapté de (Nguyen et al., 2009))

Ainsi, le problème se résume à deux limitations : d'une part, transfecter des cellules présentatrices d'antigène est difficile, probablement parce que ce sont des cellules spécialisées dans la protection contre les intrus, ce qui inclut les nanoparticules de délivrance de gènes elles-mêmes (Nguyen et al., 2009) ; et d'autre part si on opte pour la stratégie d'endocytose de l'antigène recombinant par des cellules présentatrices d'antigène, il en faut une concentration élevée en circulation et en particulier jusqu'aux ganglions lymphatiques et la rate, et donc une expression transitoire de gènes performante dans d'autres tissus capables de le sécréter (Palumbo, Zhong, & Wang, 2012). La complexité des phénomènes en jeu ajoutée à ces obstacles explique pourquoi la vaccination par ADN n'a pas encore atteint le stade clinique, alors que l'immunisation par ADN sur animaux est couramment pratiquée.

Dans ce contexte, nous avons saisi l'opportunité de tester nos formulations de polyplexes enrobés les plus prometteuses pour une utilisation *in vivo*, dans l'hypothèse où l'enrobage au CMD permet de réduire la toxicité liée à l'usage de bPEI, et en particulier de bPEI en excès selon les résultats présentés au Chapitre 5. Ainsi, il deviendrait envisageable de remplacer les techniques actuellement employées pour la génération d'anticorps – en particulier celle de l'injection hydrodynamique (Herweijer & Wolff, 2006) – par une façon de faire moins risquée et éprouvante pour l'animal. Pour ce faire, nous avons mis en place une procédure de lyophilisation permettant à la fois de découpler la préparation des polyplexes de leur injection, ainsi que de concentrer la suspension en ADNp afin d'obtenir un produit à injecter en petit volume à l'animal en quantités suffisantes pour générer une réponse immunitaire humorale. Nous nous sommes inspirés d'une étude aux objectifs similaires de concentration et de protection des performances de vecteur de délivrance de gènes non viraux grâce au dextrane de faible poids moléculaire (Anchordoquy, Armstrong, & Molina, 2005). Lors d'un premier test, la SEAP a été utilisée comme antigène modèle et a été titrée chaque semaine pendant un mois suite à l'injection intraveineuse dans des souris. Lors d'un second test, en plus de la SEAP en intraveineux, la protéine fluorescente rouge lointain mKate2 (Shcherbo et al., 2009) a été utilisée en second antigène modèle et des polyplexes enrobés encapsulant de l'ADNp l'exprimant ont été injectés en sous-cutané.

6.2.2 Résultats

Dans un premier temps, nous avons étudié plus en détail la stabilité de nos polyplexes enrobés dans le temps, afin de sélectionner l'unique formulation faisant l'objet d'un premier test *in vivo*. Nous nous sommes d'abord concentrés sur les 4 formulations jugées les plus adéquates pour un tel emploi, voir Table 5-2 au Chapitre 5 : CMD40-30, CMD70-20, CMD70-30 et CMD70-60. Nous avons donc formé des suspensions de polyplexes enrobés à une concentration adéquate pour le développement ultérieur du procédé de lyophilisation, soit 0.135 mg/mL d'ADNp. Cette concentration n'est pas suffisante pour l'injection, puisque 0.5 mg/mL à 1 mg/mL sont requis pour notre application (Christine Gadoury, communication personnelle, octobre 2014), en revanche en développant une procédure de lyophilisation adéquate, il sera possible de concentrer d'un facteur 5 à 10 cette préparation (Anchordoquy et al., 2005). Le suivi de ces polyplexes enrobés a été mené durant un mois dans notre tampon de travail régulier (HEPES 10 mM pH 7.4) en présence et en absence de PBS physiologique (150 mM de sels), voir Figure 6-7.

Ces données viennent prolonger l'étude menée au Chapitre 5 (voir Figure 5-6) dont l'unique durée étudiée était de 15 minutes après ajout de sels à concentration physiologique. On remarque dans ces résultats que le CMD40-30 est le moins stable en absence de 150 mM de sels (Figure 6-7A-C), et qu'il est à peine plus stable que les polyplexes sans enrobage en présence de ces sels (Figure 6-7B). Les polyplexes enrobés avec les trois CMD de masse molaire moléculaire plus élevée sont aussi stables que les polyplexes non enrobés sans ces sels (Figure 6-7A-C). En présence de sels, CMD70-60 confère la stabilité la plus prononcée (diamètre et PDI les plus petits) suivi dans l'ordre par le CMD70-30 et le CMD70-20 (Figure 6-7D). Nous avons donc choisi le CMD70-60 dans l'hypothèse où une plus grande stabilité est préférable.

Ensuite, nous avons vérifié que de tels polyplexes restaient stables dans un tampon classiquement employé *in vivo* : 20 mM HEPES pH 7.4 avec 5% m/v de glucose (HBG) (van Gaal et al., 2011). Ce suivi concluant est reporté Figure 6-8, ce qui nous a poussé à continuer nos investigations.

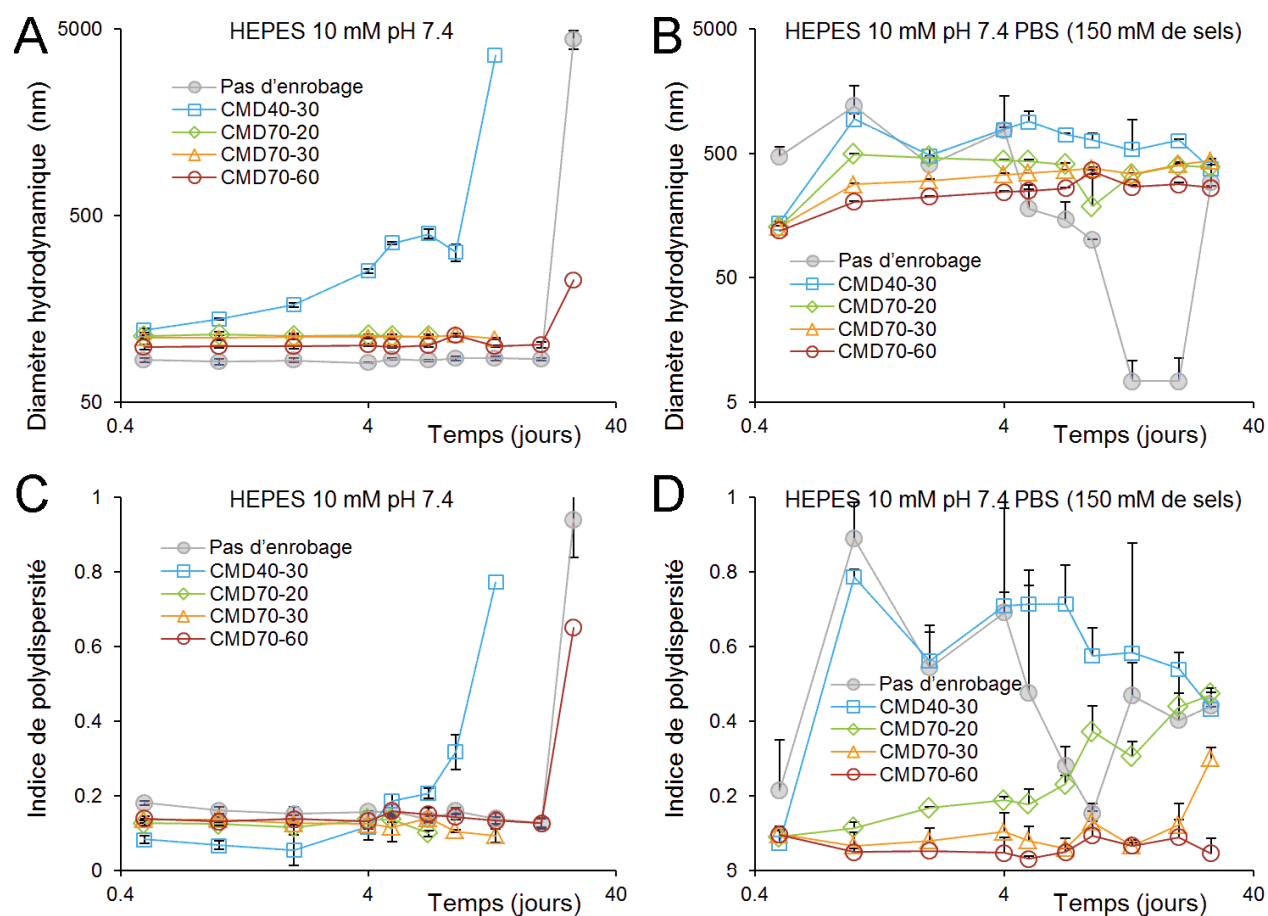


Figure 6-7 : Suivi de polyplexes enrobés par DLS durant un mois en absence de sels à concentration physiologique (gauche) ou en leur présence (droite). (n×N=3×2)

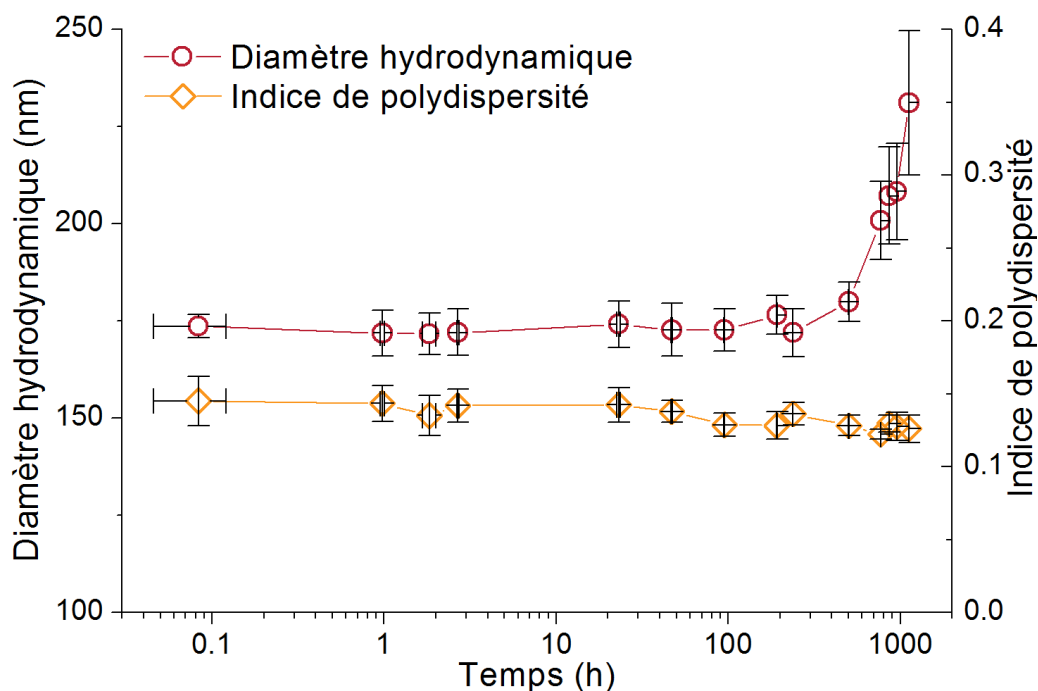


Figure 6-8 : Suivi de polyplexes enrobés au CMD70-60 dans le tampon HBG. (n×N=3×3)

À la suite de ce choix du CMD70-60, le développement de notre formulation de polyplexes lyophilisés a été mené dans le but d'obtenir une solution finale injectable isotonique et contenant 0.5 à 1 mg/mL d'ADNp. Les critères en découlant sont les suivants :

- La suspension de polyplexes fraîchement préparée doit pouvoir être concentrée lors de la réhydratation après lyophilisation car il n'est pas pratique de former les polyplexes à une concentration de 1 mg/mL d'ADNp (produit moins stable) ;
- Le tampon de préparation des polyplexes doit les conserver stables et performants ;
- Les polyplexes réhydratés doivent conserver leurs performances, et par extension leur propriétés physiques ;
- Les excipients doivent être compatibles avec un emploi *in vivo* ;
- La solution doit être isotonique après réhydratation ;
- La solution doit être neutre (pH 7.4) dès la formation des polyplexes ;

Nous avons donc sélectionné une liste d'excipients couramment utilisés pour la lyophilisation de produits pharmaceutiques (voir Tableau 2-2 au Chapitre 2) afin de développer rapidement une formulation :

- Le **tréhalose**, un disaccharide non réducteur qui est utilisé comme stabilisateur (cryoprotecteur). Il est également utilisé comme agent épaississant afin d'obtenir un lyophilisat non effondré ;
- Le tampon **Tris** (pK_a de 8.1), utilisé pour stabiliser le pH vers 7.4 et occasionnant une faible variation de pH lors de la congélation comparé au tampon phosphate (Jiang, S. & Nail, 1998) ;
- Le **dextrane T10**, ajusteur de température de transition vitreuse essentiel au procédé, ajouté au besoin en complément du CMD déjà présent dans le mélange. Il est également épaississant

Le Tableau 6-1 détaille la composition de la formulation préparée pour le premier essai. Il est à noter que la tonicité correspond à l'osmolarité effective de la solution par rapport à la membrane cellulaire ; c'est-à-dire qu'elle correspond à la somme des concentrations des constituants ne diffusant pas librement au travers de la membrane cellulaire. La tonicité a été estimée selon le calcul suivant :

$$\begin{aligned}
 \text{Tonicité} = & [\text{Tris base}] + 2[\text{Tris} \cdot \text{HCl}] + [\text{Tréhalose}] + [\text{ADNp}] \left(1 + \frac{M_{\text{base}}}{M_{\text{ADNp}}} \right) \\
 & + [b\text{PEI}] \left(\frac{1}{2.4} + \frac{M_{\text{amine}}}{M_{b\text{PEI}}} \right) + [\text{CMD}] \left(1 + \frac{M_{\text{carboxyle}}}{M_{\text{CMD}}} \right) \\
 & + [\text{Dextrane T10}] \left(\frac{M_{\text{AGU}}}{M_{\text{Dextrane T10}}} \right)
 \end{aligned}$$

Où les concentrations des polyélectrolytes sont en moles de porteurs de charge (voir Tableau 6-1) et celle du dextrane en moles d'AGU.

Équation 6-1 : Calcul de la tonicité des solutions à injecter. Le Tris base et le tréhalose ne sont pas chargés et n'ont pas de contre ion ; le Tris•HCl est constitué de 2 ions ; les bases de l'ADNp s'accompagnent d'un contre ion, tout comme une amine du bPEI sur 2.4 ainsi que les carboxylates du CMD.

Tableau 6-1 : Composition et tonicité résultante de la formulation du premier test *in vivo*.

Constituant		Formulation
Tris	<i>mM</i>	60
Tréhalose	<i>mM (mg/mL)</i>	136 (46.5)
ADNp (SEAP)	<i>mM de P (mg/mL)</i>	1.5 (0.5)
bPEI	<i>mM de N (mg/mL)</i>	9 (0.4)
CMD70-60	<i>mM de C (mg/mL)</i>	4.5 (1.8)
Dextrane T10	<i>mM d'AGU (mg/mL)</i>	228 (3.7)
Tonicité	<i>mOsm</i>	≈ 260

Remarquons ici que l'utilisation combinée du tréhalose et du dextrane (carboxyméthylé ou non) est une stratégie similaire à la combinaison sucrose-dextrane 5 kDa dont nous nous sommes inspirés (Anchordoquy et al., 2005). Les polyplexes ainsi préparés ont été caractérisés par DLS (**Figure 6-9**) ainsi que par un test *in vitro* (Figure 6-10) préalablement aux injections.

Nous avons utilisé un lyophilisateur VirTis adVantage Plus (SP Scientific). Le cycle que nous avons mis en place pour le premier test *in vivo* est constitué des étapes suivantes :

- Congélation puis recuit à -50°C à 50 kPa pendant 60 min ;
- Séchage primaire : 1250 min à -30°C et 4 Pa (0.03 Torr) ;
- Séchage secondaire : +1°C/min jusqu'à 15°C et maintien pendant 120 min à 2.6 Pa.

Son application à des échantillons placés dans des tubes de borosilicate à fond plat s'est révélée satisfaisante.

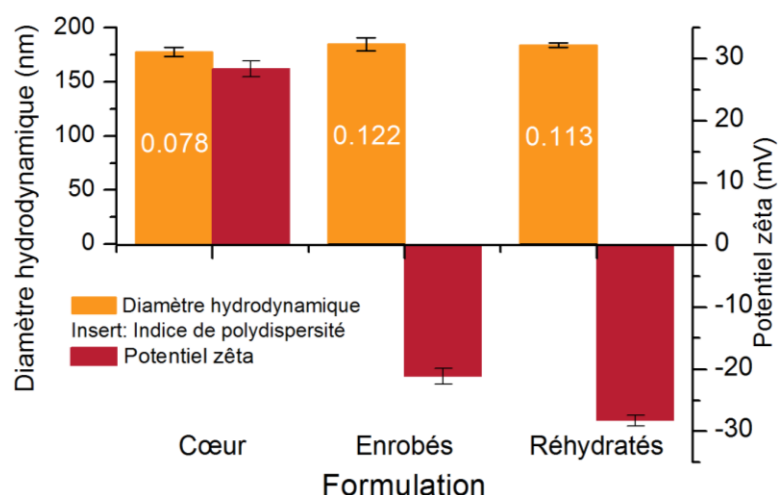


Figure 6-9 : Caractérisation physique des polyplexes enrobés au CMD70-60 pour le premier essai *in vivo*. (n×N=4×1)

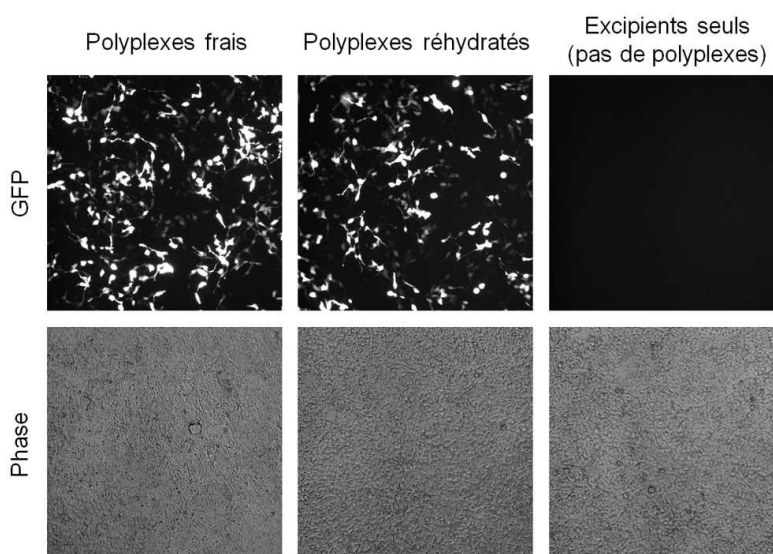


Figure 6-10 : Vérification des performances de transfection *in vitro* de polyplexes enrobés au CMD70-60 ayant subi la lyophilisation puis une réhydratation concentrée. (n×N=1×2)
 Cellules HEK293-6E adhérentes cultivées dans du milieu F17 avec 10% de FCS transfectées à 5 µg/mL d'ADNp avec des polyplexes enrobés au CMD70-60 contenant du plasmide exprimant la GFP. Photos prises 2 jpt.

Les caractérisations physique et *in vitro* ont indiqué une bonne stabilité des polyplexes ainsi qu'un pouvoir de transfection bien présent et préservé par la lyophilisation. Le test *in vivo* a donc été mené, tout d'abord par une injection intraveineuse unique de 0.2 mL de polyplexes

enrobés à 0.5 mg/mL d'ADNp dans 3 souris, et une injection unique de contrôle dans une quatrième souris sans qu'aucune séquelle visible ne se manifeste. Un échantillon de plasma a ensuite été prélevé hebdomadairement pendant un mois. Enfin, la SEAP a été dosée par test ELISA dans chaque échantillon. Ce dosage a révélé une absence de SEAP détectable, indiquant un échec de la procédure.

Un second essai a tout de même été mis en place afin de tester deux nouvelles formulations – basées sur le CMD40-30 et le CMD40-03 – ainsi qu'une nouvelle voie d'administration – sous-cutanée. Une suspension de polyplexes enrobés au CMD40-03 a elle aussi été suivie afin de vérifier que cet enrobage était suffisamment stable pour permettre la lyophilisation, voir Figure 6-11.

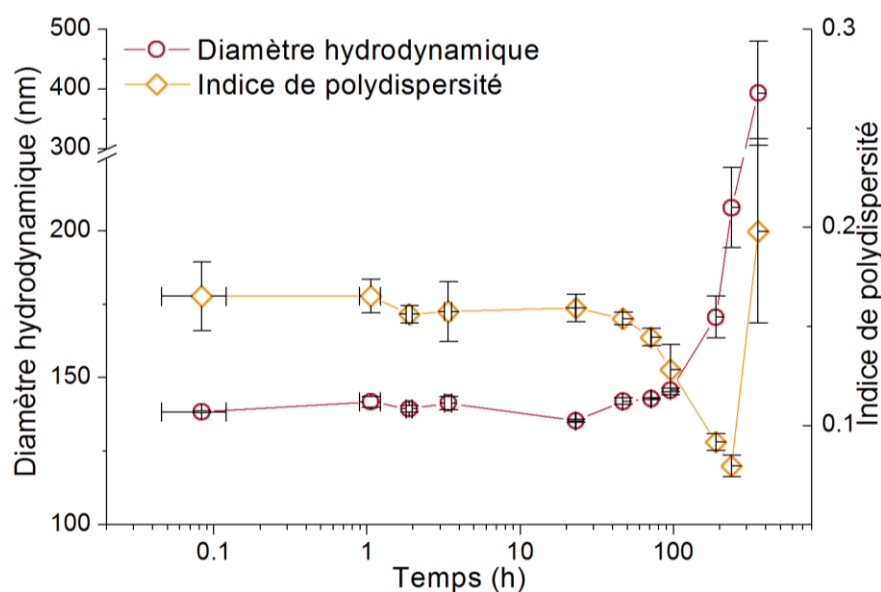


Figure 6-11 : Suivi de polyplexes enrobés au CMD40-03 dans le tampon HBG. (n×N=3×3)

Les caractéristiques des 4 formulations ainsi que leur mode d'administration sont reportés Tableau 6-2. Le choix de ces deux CMD provient de la remise en cause de l'hypothèse selon laquelle il faut rechercher la plus grande stabilité des polyplexes enrobés telle que nous l'évaluons. Dans cette nouvelle hypothèse, nous avons tout de même veillé à générer des polyplexes enrobés restant stables avant lyophilisation afin que notre procédure reste robuste et répétable. Nous avons également choisi d'augmenter les doses d'ADNp à injecter en visant une concentration finale d'ADNp de 1 mg/mL. Cela nous a conduit à augmenter la quantité de CMD dans nos formulations d'un rapport C:N:P de 3:6:1 à 6:6:1.

Tableau 6-2 : Caractéristiques des formulations du deuxième test *in vivo*.

Constituant		Formulation			
		A	B	C	D
Tris	<i>mM</i>	75	75	75	75
Tréhalose	<i>mM (mg/mL)</i>	88 (30)	88 (30)	88 (30)	88 (30)
ADNp (mKate2)	<i>mM de P (mg/mL)</i>	3 (1)	3 (1)	-	-
ADNp (SEAP)	<i>mM de P (mg/mL)</i>	-	-	3 (1)	3 (1)
bPEI	<i>mM de N (mg/mL)</i>	18 (0.8)	18 (0.8)	18 (0.8)	18 (0.8)
CMD40-03	<i>mM de C (mg/mL)</i>	18 (48)	18 (48)	18 (48)	-
CMD40-30	<i>mM de C (mg/mL)</i>	-	-	-	18 (9.4)
Dextrane T10	<i>mM d'AGU (mg/mL)</i>	-	-	-	247 (40)
Tonicité	<i>mOsm</i>	≈ 260	≈ 260	≈ 260	≈ 260
Voie d'injection		Sous-cutanée		Intraveineuse	
Diamètre	<i>nm → nm (avant et</i>	160±1	152±3	171±4	172±3
hydrodynamique	<i>après lyoph./réhyd.)</i>	→174±2	→162±3	→300±1	→183±3
Indice de	<i>(avant et après</i>	0.12±0.02	0.11±0.01	0.1±0.01	0.1±0.03
polydispersité	<i>lyophilis./réhydrat.)</i>	0.13±0.02	0.14±0.01	0.26±0.002	0.1±0.04

Le cycle mis en place pour le second test *in vivo* est constitué des étapes suivantes :

- Congélation à -50°C puis stabilisation à -30°C à 50 kPa pendant 15 min ;
- Séchage primaire : 1000 min à -30°C et 13.3 Pa (0.1 Torr) ;
- Séchage secondaire : +1°C/min jusqu'à 15°C et maintien pendant 15 min à 13.3 Pa.

Son application à des échantillons placés dans des tubes de borosilicate à fond plat s'est révélée satisfaisante, tout en sollicitant moins la pompe à vide de l'instrument et en constituant un cycle durant moins de 24 h.

Les caractérisations physique et *in vitro* sont reportées Tableau 6-2 et **Figure 6-12**. Le test *in vitro* a été réalisé avec des cellules en suspension afin de faciliter le dosage de SEAP dans le surnageant de culture. La sécrétion de SEAP par des cellules HEK293-6E transfectées au moyen des formulations C et D a été dosée à 5 jpt et comparée à un polyplexe extemporané de bPEI/ADNp au rapport N:P de 6:1. À 1 $\mu\text{g/mL}$ d'ADNp dans le milieu de culture, les formulations C et D ont donné respectivement 1.6 et 1.5 mg/L de SEAP sécrétée (2.0 mg/L pour le contrôle). À 5 $\mu\text{g/mL}$ d'ADNp dans le milieu de culture, les formulations C et D ont donné respectivement 24 et 22 mg/L de SEAP sécrétée (42 mg/L pour le contrôle). Ces taux sont en accord avec les performances du bPEI au rapport N:P peu élevé de 6:1 pour cette lignée cellulaire.

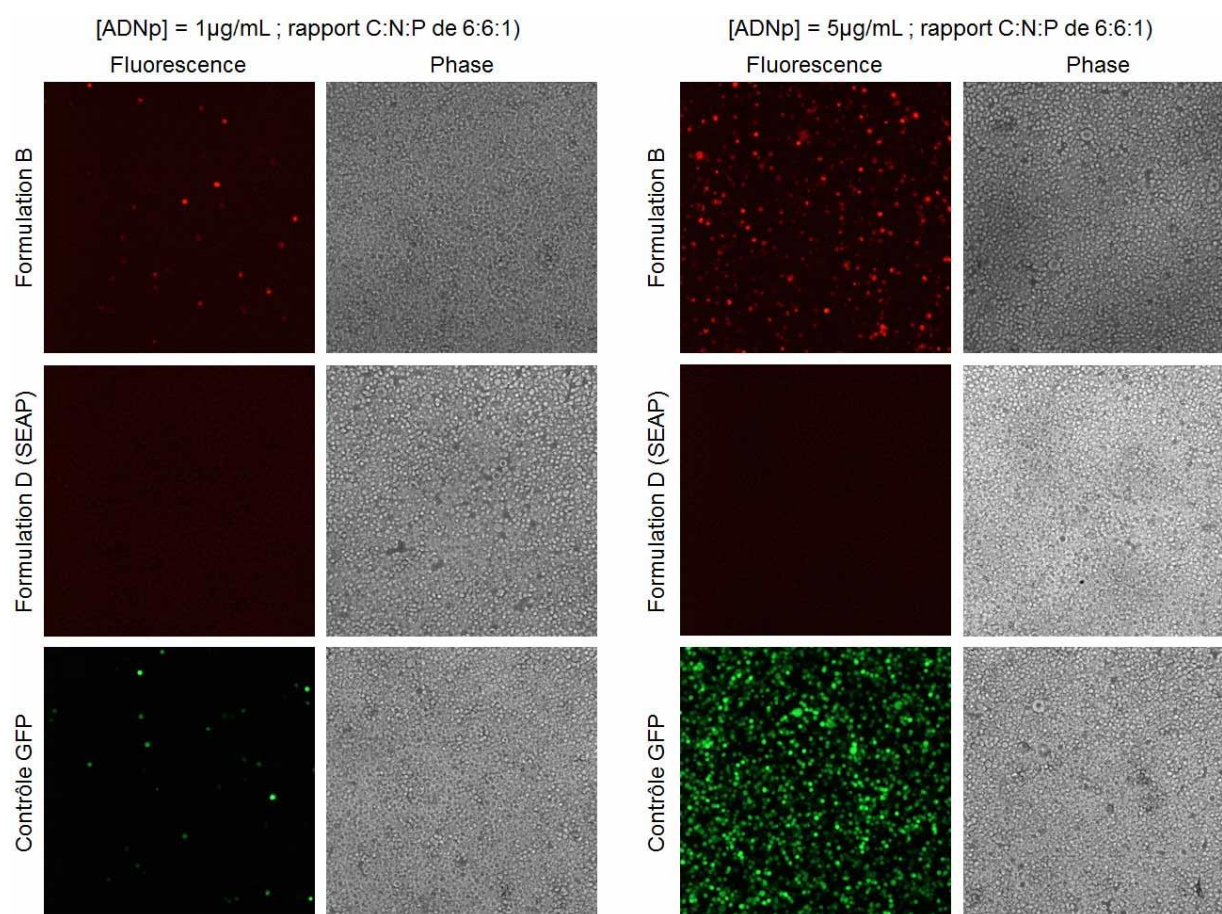


Figure 6-12 : Vérification des performances de transfection *in vitro* des formulations B et D ayant subi la lyophilisation puis une réhydratation concentrée. (n×N=1×1) Cellules HEK293-6E en suspension cultivées dans du milieu F17 transfectées à 1 ou 5 $\mu\text{g/mL}$ d'ADNp avec des polyplexes enrobés contenant du plasmide exprimant la mKate2 (B) la SEAP (D) ou la GFP (contrôle polyplexes extemporanés bPEI/ADNp au rapport N:P de 6:1). Photos prises 2 jpt.

Les 4 souris ayant reçu la première injection ont été utilisées à nouveau pour ce second test planifié 16 semaines plus tard. Chaque souris a reçu une combinaison de deux injections – intraveineuse et sous-cutanée – différente : A-C ; B-C ; A-D et B-D. Les 4 souris ont été retrouvées mortes le lendemain de ces doubles injections.

6.2.3 Discussion

La première série d'injections menée sur 4 souris s'est soldée par un échec en termes d'expression de r-protéine. Une dose de PEI insuffisante pour permettre un échappement endosomal significatif des polyplexes est une des causes probables. Un autre facteur à prendre en compte est lors d'une administration systémique de polyplexes au PEI dans des souris, l'organe présentant l'expression transitoire de gènes la plus élevée est le poumon (Goula et al., 1998). Cela est dû à la propension des polyplexes PEI/ADNp à former des agrégats entre eux ainsi qu'avec les protéines du plasma (opsonisation) et les globules rouges, de sorte que ces amas viennent se bloquer dans les capillaires pulmonaires (Ogris et al., 1999). Nos polyplexes enrobés ayant été spécialement conçus pour abroger à la fois leur agrégation en milieu physiologique, ainsi que l'opsonisation et l'agrégation de globules rouges, une efficacité de transfection relativement plus faible était à prévoir dans les poumons. Par ailleurs, la diminution de la capacité brute des polyplexes PEI/ADNp à transfecter lors de l'adjonction d'une couronne hydrophile – par PEGylation (Ogris et al., 1999) ou par enrobage électrostatique (voir Section C.1 annexe C) – a certainement participé à rendre la sécrétion de SEAP indétectable dans le plasma des souris.

Sélectionner le CMD40-03 comme agent d'enrobage de polyplexe pour une injection sous-cutanée était potentiellement risqué pour les animaux, du fait des mauvais scores de cet enrobage lors des tests *in vitro* sur les performances en environnement physiologique. En plus de cela, augmenter les doses des injections par rapport au premier test et administrer deux injections par animal a certainement augmenté ce risque. Ces choix ont été faits dans le but de limiter l'envergure du second test à la cohorte initiale de souris, mais se sont révélés fatals.

En conclusion, nous n'avons pas abouti à une procédure améliorée pour l'immunisation de souris, en revanche ces essais *in vivo* suggèrent un certain pouvoir prédictif de notre étude systématique *in vitro* réalisée sur notre chimiothèque de CMD.

DISCUSSION GÉNÉRALE

*But though the professed aim of all scientific work is to unravel the secrets of nature,
it has another effect, not less valuable, on the mind of the worker.
It leaves him in possession of methods which nothing but scientific work
could have led him to invent, and it places him in a position from which
many regions of nature, besides that which he has been studying,
appear under a new aspect.*

Pr. James Clerk Maxwell 1873 (*The theory of molecules*, p 286 in *The popular science monthly*¹⁹)

La délivrance de gènes est un domaine multidisciplinaire qui a grandi avec la biotechnologie depuis les années 1960. Le volet clinique de ses applications a été initié dès la fin des années 1980 grâce aux premiers vecteurs viraux, mais les résultats sont restés en dessous des attentes de la communauté avec l'apparition d'effets secondaires graves. Le domaine s'est graduellement remis grâce à des avancées de toutes parts issues d'un besoin accru de caractériser les vecteurs, de les sécuriser, d'en faciliter la préparation, l'emploi, *etc.* Cela a extrêmement ouvert et diversifié le marché des techniques et vecteurs de délivrance de gènes *in vitro*, mais également *in vivo*. En ce moment, nous sommes toujours dans cette phase de transition entre la découverte de nouveaux matériaux et techniques et leur transfert clinique. Étendre et consolider les connaissances acquises est nécessaire pour aller de l'avant. Pour ce faire, des efforts extraordinaires sont requis devant l'ampleur et la diversité grandissante des données collectées. C'est dans ce contexte que s'inscrivent nos travaux. Nous avons opté pour la mise en évidence de relations structure-fonction quantifiées et non pas dichotomiques. Nous nous sommes donc donné les moyens de varier pas à pas le paramètre étudié, que ce soit la décoration avec un ligand, ou l'enrobage hydrophile anionique de polyplexes. Voyons maintenant ce que l'on peut tirer conjointement de nos travaux.

Dans la première étude, après avoir mis en place un système d'attache de biomolécules à la surface de polyplexes, nous nous étions intéressés à l'influence de cette décoration sur leur

¹⁹ Source : (<http://books.google.ca/books?id=MhELAAAYAAJ&pg=PA286#v=onepage&q&f=false>)

voie d'endocytose. Ce faisant, nous avons observé qu'en passant du rapport N:P de 3:1 à 5.5:1, l'amplitude de la réponse spécifique à EGFR était environ triplée. Comme ce phénomène était corrélé à deux autres mesures – le taux d'attachement de polyplexes aux cellules et leur potentiel zêta, – nous avons donc conjecturé qu'une augmentation du potentiel zêta permettait d'augmenter l'affinité non spécifique des polyplexes pour la membrane cellulaire – chargée négativement de par la présence de protéoglycanes à sulfate d'héparane. Ensuite, augmenter la quantité de polyplexes en contact avec la membrane plasmique expliquait que l'influence de la décoration soit exacerbée.

Ces travaux illustrent bien le fait que cibler des vecteurs en les décorant avec des biomolécules ne constitue pas une approche du type « tête chercheuse. » En effet, il ne s'agit pas d'un système de guidage à distance mais au contraire d'un mode de détection par contact. Or dans l'absolu, ce dernier ne peut être efficace que si :

1. Les vecteurs ne sont pas entravés avant même de rencontrer leurs cibles ;
2. Les vecteurs sont effectivement capables de détecter leurs cibles lorsqu'ils sont en contact avec celles-ci ;
3. Le corollaire étant que seules les cellules présentant la cible seront touchées.

Ces points sont dépendants de l'adéquation entre le couple ligand-récepteur à la base du ciblage et la biodistribution de ce récepteur sur la cible ainsi que dans l'environnement où circulent les nanoparticules. Il dépend également de la spécificité de l'interaction ligand-récepteur. Ces deux considérations peuvent être établies *a priori* et conduisent normalement à la sélection d'un couple ligand-récepteur pertinent pour ce type d'étude. Il y a en revanche un autre facteur déterminant dans la potentialisation du ciblage : la surface de la nanoparticule. La décoration ne recouvre pas complètement les polyplexes ; or le comportement de ces derniers va être dicté par l'interface les séparant de l'environnement. En formant des polyplexes modèles à partir d'ADNp et d'un excès de bPEI, la surface générée était essentiellement constituée de chaînes de PEI, dont seule la conformation pouvait dépendre du rapport N:P utilisé. Ainsi, dans notre première étude, la marge de manœuvre pour contrôler la nature de la surface des polyplexes était assez limitée. Le PEI a été choisi ici comme modèle pour de nombreuses raisons pratiques. Cela fait vingt ans qu'il a été proposé comme agent de transfection, et il perdure grâce à sa combinaison de points forts : haute densité de charge, effet d'éponge à protons, simplicité de

mise en œuvre, et faible coût. Ses plus sérieux défauts – toxicité aux échelles physiologique et cellulaire, besoin d'un excès sous forme libre, import nucléaire faible – en font aujourd'hui un candidat assez peu représenté dans la recherche clinique pour la délivrance de gènes *in vivo*.

À ce stade, il est intéressant de transposer concrètement les trois points vers lesquels un système de ciblage par décoration doit tendre pour une application *in vivo*. Après injection systémique, un polyplexe ciblé pour délivrer un gène à des cellules tumorales devrait :

1. Passer inaperçu tant qu'il ne rencontre pas la tumeur (c'est-à-dire rester stable et en circulation dans le sang aussi longtemps que nécessaire) ;
2. Détecter la cible moléculaire marquant les cellules tumorales au moyen de son ligand spécifique (lorsqu'il finit par se retrouver au contact de la tumeur) ;
3. N'avoir aucun effet ou interaction s'il ne rencontre pas de cible (corollaire aux deux points précédents).

Afin de prolonger le temps de résidence systémique de la nanoparticule (point 1), il est généralement conseillé de ne pas exhiber de charges positives, autre raison défavorable au PEI. Au contraire, une surface hydrophile chargée négativement serait plus pertinente pour une circulation dans le sang. Ainsi, dans une deuxième étude, nous nous sommes intéressés à un enrobage anionique hydrophile dont les propriétés de la surface engendrée pouvaient être modulées. Ce volet concernant la chimiothèque de CMD pour l'enrobage de polyplexes a apporté des résultats très intéressants sur la relation entre des éléments de structure de l'interface polyplexe/environnement et leur fonction dans le cadre de la délivrance de gènes *in vivo*. Cela nous a permis de présélectionner 4 CMD parmi 26 comme bon candidats pour de futures applications. Ainsi, nous avons choisi l'un de ces 4 CMD – le CMD70-30 – pour implémenter notre système d'attache par superhélice EK sur des polyplexes enrobés. Le ciblage du récepteur EGFR par décoration avec Ecoil-EGF a ainsi pu être évalué *in vitro* sur des cellules A549 (provenant d'un adénocarcinome pulmonaire humain) sur-exprimant EGFR. Ce résultat a démontré l'efficacité de notre système d'attache par superhélice EK sur des polyplexes enrobés de CMD. L'effet spécifique n'a cependant pas eu d'impact sur la délivrance de gène car l'enrobage lui-même promouvait l'endocytose des polyplexes en compétition directe avec l'endocytose *via* l'activation d'EGFR, sans que le routage spécifique à ce dernier n'apporte d'avantage décisif en termes d'expression de gène rapporteur. Bien que, d'après la littérature, le

CMD est un bon matériau pour favoriser la résidence systémique, sa propension à l'endocytose pourrait limiter ce temps de résidence. Une revue récente discute des voies d'endocytose du dextran du point de vue immunologique (Pustynnikov, Sagar, Jain, & Khan, 2014). Il en ressort que des familles de récepteurs (lectines de type C, en particulier la famille DC-SIGN et les récepteurs du mannose) associés à la détection de pathogènes (microbes et virus) peuvent déclencher l'internalisation du dextran dans certains types cellulaires exprimant ces récepteurs, principalement des cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques, macrophages). Cela semble encourageant pour une application en immunisation; toutefois les auteurs précisent que le dextran est un ligand interte de ces récepteurs, c'est-à-dire que leur reconnaissance par ces récepteurs n'induit pas la production de cytokines qui leur est normalement associée en cas de détection de pathogène. En outre, l'internalisation non spécifique de dextran par pinocytose coexiste avec ces voies spécifiques.

Cela a un impact sur le point 3 : le polyplexe aura tendance à se faire endocyter par des cellules non ciblées. Une solution serait que l'endocytose *via* le CMD conduise à un routage intracellulaire défavorable à l'expression de gènes, dans ce cas l'endocytose non spécifique de polyplexe n'aurait pas de conséquences autres que la perte de celui-ci. Nos essais *in vivo* semblent indiquer que c'est le cas puisque suite à une injection intraveineuse de polyplexes enrobés, la r-protéine exprimée par le gène rapporteur est restée indétectable dans le plasma. Il reste que cela ne peut être vraiment utile que si on peut trouver un ligand de ciblage influant sur la voie d'endocytose au point de mener à une expression de gène réussie (point 2). EGF est un bon candidat pour cela, il permet la localisation périnucléaire d'endosomes formés à partir de son activation (Louvier, 2015; Marti et al., 1991). Malgré toutes ces remarques allant dans la bonne direction, le système dans son ensemble (polyplexe enrobé et décoré avec Ecoil-EGF pour transfecter spécifiquement des cellules tumorales sur-exprimant EGFR) ne fonctionne pas. L'explication la plus probable est que malgré un routage d'une partie des endosomes contenant les polyplexes ciblés vers le noyau au moyen de l'activation d'EGFR, les polyplexes restent piégés dans ces vésicules et sont dégradés dans les lysosomes. Les polyplexes endocytés sans médiation d'EGFR mais grâce à l'enrobage de CMD auront probablement le même sort. Ce qui nous amène au problème de fond sous-jacent à toutes les études menées durant ce doctorat: l'échappement endosomal.

C'est un obstacle s'est continuellement dressé devant nos polyplexes durant ces travaux. Bien que la capacité du PEI comme de l'oligohistidine à promouvoir l'échappement des polyplexes des endosomes est généralement admise (Tiera et al., 2011), il en ressort un clair manque d'efficacité de ces deux composants. En effet, les propriétés d'échappement endosomal de ces polyplexes sont directement liées au principe de l'éponge à protons et nécessitent une quantité élevée d'amines protonables pour déclencher un échappement performant (voir Schéma 6-4).

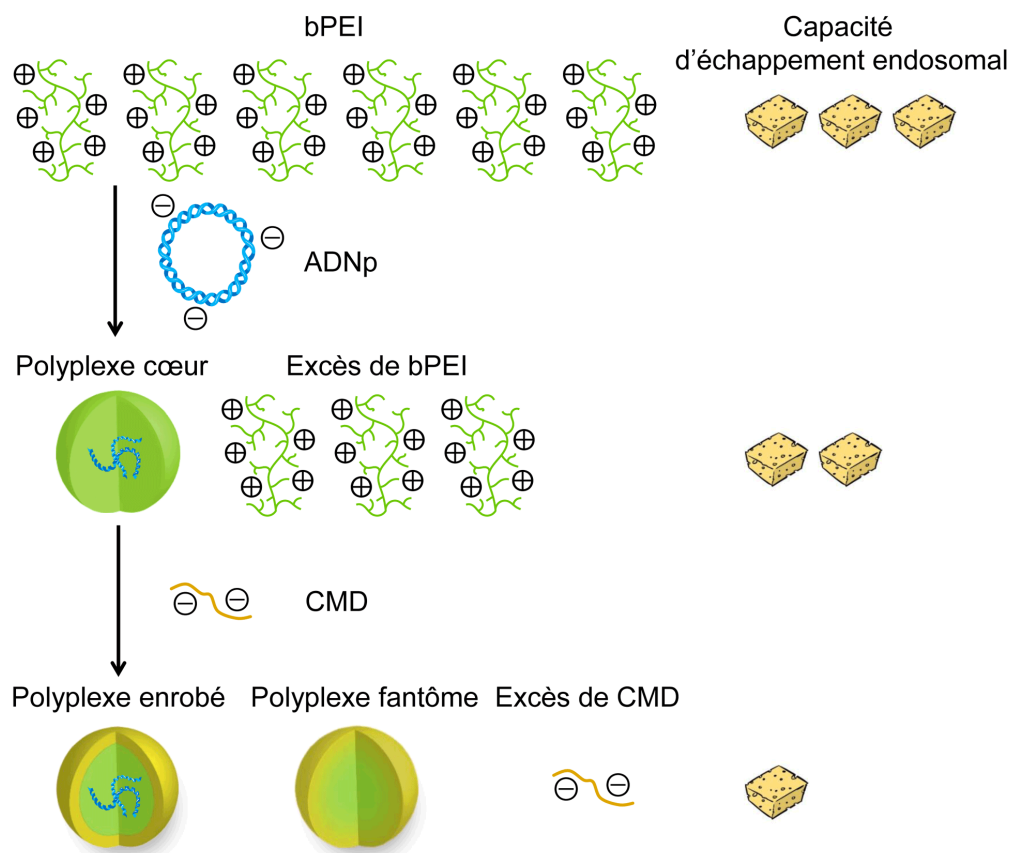


Schéma 6-4 : Importance du rôle du polycation en excès dans l'échappement endosomal.

Cela signifie que dans ce paradigme, les polyplexes ne peuvent pas s'échapper avec efficacité des endosomes de manière autonome si l'excès de polycation est séparé des polyplexes (Burke, Pun, & Reineke, 2013). Des essais de transfection à partir de polyplexes purifiés séparés du PEI libre en excès ont indiqué que des doses plus élevées étaient requises afin de retrouver l'efficacité de la transfection en présence de PEI en excès (Boeckle et al., 2004). Cela suggère qu'une masse critique de PEI – complexé ou non – est nécessaire au succès d'un événement de transfection, et donc qu'un polyplexe à lui seul est généralement insuffisant. Pour appuyer ce

point, il est important d'avoir à l'esprit que l'ADNp d'intérêt n'est pas limitant ici, en effet plus de la moitié de l'ADNp constituant le polyanion lors de la polyplexation peut être remplacé par de l'ADN non codant voire même un polyanion d'une autre nature et mener à une efficacité de transfection similaire (Kichler, Leborgne, & Danos, 2005). En outre, lors de nos tests d'expression *in vitro*, il a été observé que seulement 10% de plasmide encapsulé exprimant la GFP étaient suffisants afin d'évaluer le taux de transfection de nos formulations par la détection de cette r-protéine.

Cette faiblesse à l'échelle d'un polyplexe isolé se traduit dans la quantité totale de polyplexes (N) nécessaire pour transfecter efficacement une cellule *in vitro*, qui peut être calculée rapidement en considérant :

$$N = \frac{[ADNp] \mathcal{N}_A}{n_{ADNp} M_{ADNp} d_{cellulaire}} \approx 1000 \text{ polyplexes/cellule}$$

Où : - $n_{ADNp} = 100$ copies d'ADNp par polyplexe (Bhise et al., 2012) ;

- $M_{ADNp} = 4$ MDa (plasmide d'environ 6 kpb) ;

- $[ADNp] = 1$ µg/mL de culture à transfecter ;

- $d_{cellulaire} = 1.5 \times 10^6$ cellules/mL lors de la transfection ;

Cette approximation du nombre de polyplexes rendant la transfection efficace se situe vers le haut de la gamme du nombre de virions nécessaire pour déclencher une infection (Brandenburg & Zhuang, 2007). Par exemple, ce nombre se situe entre 50 et 200 pour le virus de l'herpès, vers 10 000 pour le papillomavirus, ou encore vers 10 pour des réovirus (Flint, Enquist, Racaniello, Rall, & Skalka, 2008). La comparaison est limitée puisque l'unité correspondant à ces nombres est le nombre de particules par plaque de lyse (*particle to plaque-forming ratio*), une mesure bien spécifique à la caractérisation de virus. Il faut toutefois considérer un autre aspect critique : ces nombres pouvant être assez élevés traduisent le fait que dans la majorité des cas la tentative d'infection par un virion est futile, mais il demeure qu'en cas de succès un virion peut déclencher une infection à lui seul (Racaniello, 2011). Il n'en est probablement pas de même pour les polyplexes, pour lesquels la présence de polycation en excès participe directement aux événements de transfection réussis.

Quelles leçons pouvons-nous tirer de cet état de fait ? Premièrement, augmenter la dose d'ADNp – et donc de polyplexes – pour la délivrance de gènes n'apportera pas de solution quant à la capacité d'un polyplexe isolé à transfecter efficacement une cellule. Cela n'est pas forcément rédhibitoire. En effet pour les applications *in vitro*, les défis liés à la biodistribution sont absents : les polyplexes, ainsi que l'excès de polycation libre, sont en présence d'un unique type cellulaire dans un environnement bien défini (le bioréacteur). *In vivo*, il existe des applications où le polycation en excès injecté en même temps que les polyplexes va pouvoir se retrouver au même endroit – en termes de tissus, de cellules, voire même d'endosomes ; c'est probablement le cas par exemple pour la transfection au PEI chez la souris au niveau des poumons car il a été reporté que transfecter avec une dose fixe d'ADNp gagne en efficacité en accroissant la quantité d'excès de PEI présente (Kichler et al., 2005). D'autre part, les gènes ne sont qu'une catégorie d'acides nucléiques que l'on cherche à vectoriser. Grâce à toutes les connaissances accumulées à son sujet, la famille des PEI et de ses dérivés garde un rôle prépondérant pour la délivrance *cytoplasmique* de petits acides ribonucléiques incluant petits ARN interférents, micro ARN, ribozyme, et leurs dérivés (Höbel & Aigner, 2013).

Deuxièmement, dans l'hypothèse où on pourrait doter un polyplexe enrobé d'un système fonctionnel d'échappement endosomal, il faudrait conditionner son action à l'endocytose spécifique ayant eu lieu dans les cellules ciblées, et non lorsque le polyplexe s'est retrouvé endocyté de manière non spécifique ailleurs, faute d'avoir rencontré sa cible. Dans ce cas, déclencher un échappement endosomal suite à l'acidification de l'endolysosome n'est pas suffisamment spécifique. Il faudrait capitaliser sur la présence combinée de l'acidification et d'un second signal, par exemple une enzyme présente plus spécifiquement dans les cellules ciblées que dans le reste des tissus susceptibles d'endocyter les polyplexes. Des travaux en ce sens ont par exemple été initiés avec la métalloprotéinase matricielle 2 (Zhu et al., 2012) ou des membres de la famille des cathepsines (Dash et al., 2000). Dans ce plan d'action, de nouvelles stratégies naîtront probablement de l'identification de nouveaux marqueurs spécifiques aux tissus ciblés.

•

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Caractériser les relations entre structure et fonction est un besoin concret et nécessaire pour l'avancement de la vectorisation non virale de gène, comme cela a été récemment mentionné (Yin et al., 2014) :

« Further clinical progress will be facilitated by additional biological insights into the key rate-determining steps that limit effective delivery and by a more complete understanding of structure–function relationships for DNA delivery materials. »

Nous avons mené deux études approfondies qui nous ont permis de dresser de telles relations – une concernant la décoration avec une protéine, l'autre sur l'enrobage électrostatique avec un polyanion hydrophile.

Dans la première, le système d'attache par superhélice EK a été mis en place avec succès sur des polyplexes modèles pour la délivrance de gènes. Il nous a permis d'étudier finement la densité de décoration nécessaire au ciblage d'EGFR de cellules A431 au moyen d'Ecoil-EGF. Ce contrôle fin a pu être réalisé en attachant cette biomolécule de manière orientée et spécifique par auto-assemblage en solution sur les peptides complémentaires Kcoil préalablement greffés en surface des polyplexes. En quantifiant la relation entre la densité de décoration à la surface des polyplexes et leur taux d'endocytose *via* EGFR, nous avons mis en évidence la synergie entre la charge de surface des polyplexes et la densité de ligand de ciblage. Cibler un tel récepteur cellulaire pour contrôler l'endocytose ainsi que le routage intracellulaire de polyplexes présente de l'intérêt pour des applications *in vitro* comme la production de r-protéines, mais également pour la délivrance de gènes *in vivo*, en particulier dans la lutte contre le cancer. Cela a orienté la suite de ce doctorat vers la conception d'un enrobage de polyplexes mieux à même de contrôler la nature de la surface des polyplexes pour des applications *in vivo*.

Dans cette seconde étude, nous avons choisi de travailler avec le dextrane, un biopolymère aisé à fonctionnaliser et à l'utilisation clinique éprouvée. Nous avons préparé une chimiothèque de polyanions hydrophiles en carboxyméthylant plusieurs dextranses de masses molaires moléculaires différentes. Les 26 dextranses carboxyméthylés (CMD) obtenus et caractérisés chimiquement ont été utilisés pour l'enrobage électrostatique de polyplexes modèles.

Ces polyplexes ont fait l'objet d'une étude systématique de leurs performances en présence de constituants clés de l'environnement physiologique : les sels, les nucléases, les protéines du plasma, les globules rouges, et les cellules cibles. Plusieurs relations ont été dressées entre d'un côté le poids moléculaire et la densité de charge du CMD et de l'autre côté la prévention de l'agrégation, la protection contre les nucléases, la prévention de l'opsonisation et de l'agrégation des globules rouges et l'expression de gènes rapporteurs, et ce en termes de charge de surface ainsi que de stabilisation stérique et latérale.

Par la suite, des essais de délivrance de gènes chez des souris ont été initiés au moyen de polyplexes enrobés. Cette étude exploratoire réalisée dans le cadre de l'immunisation pour la génération d'anticorps n'a pas permis d'obtenir d'expression satisfaisante des gènes rapporteurs. Il en ressort tout de même des indications très encourageantes quant au pouvoir prédictif de notre série de tests *in vitro* sur le comportement de polyplexes *in vivo*.

Enfin, dans la poursuite des travaux effectués selon les différents axes abordés dans ce doctorat, plusieurs voies nous semblent prometteuses :

- **Investir dans la sensibilité au pH endolysosomal :** Capitaliser sur les connaissances acquises sur les CMD (influence couplée de la masse molaire moléculaire et de la densité de charge) avec une fonction à charge convertible comme un carboxylate au pK_a d'environ 5.5 (comme cela est le cas pour le motif trileucine (Ding et al., 2013), ou le PPAA (Lee, L. K. et al., 2006)). L'emploi d'une fonction à inversion de charge – comme l'amide d'acide *cis*-aconitique ou l'amide d'acide citraconique (Lee, Y. et al., 2010) – serait également à considérer. Les dextrans restent un excellent matériau de départ pour de telles études. Ce type de stratégie permettrait de déclencher l'échappement endosomal seulement quand et où il est requis, afin de découpler cette phase des précédentes où d'autres propriétés de surface sont requises.
- **Faire une étude *in vivo* de biodistribution des polyplexes enrobés,** car de nombreuses applications pourraient bénéficier d'un enrobage de nanoparticules facile à moduler. Si une telle étude révélait que cette modulation permet de contrôler la biodistribution de nanoparticules, des applications plus spécifiques pourraient alors être envisagées. Une grande liberté est permise pour le choix du modèle animal car cela se situerait dans un cadre prospectif. Enfin, mener une étude de ce type permettrait de consolider la valeur de

notre étude systématique *in vitro* en validant son pouvoir prédictif sur un emploi *in vivo*. Cela bénéficierait grandement à la communauté de pouvoir compter sur une série de tests *in vitro* pour le criblage de formulations destinées à la recherche préclinique et clinique.

- **Explorer la décoration multiplexe**, dans une application où elle serait justifiée. En particulier, les r-protéines étiquetées d'un peptide Ecoil déjà disponibles et pertinentes pour ce type d'étude sont :
 - Ecoil-EGF (Boucher et al., 2008) ;
 - Ecoil-VEGF (Murschel et al., 2013) ;
 - Ecoil-βFGF (Cyril Addi, communication personnelle, mars 2015)
 - Ecoil-GALA (voir Section 6.1 et (Louvier, 2015)) ;

En effet, les trois premières sont des facteurs de croissance dont l'usage conjoint pourrait trouver une application en génie tissulaire et en délivrance contrôlée (Chu, H. & Wang, 2012; Masters, 2011; Moss, Sharma, & Brindle, 2009). Quant à la quatrième, il est pertinent dans ce contexte car il a été récemment reporté que la séquence GALA permet de cibler l'épithélium pulmonaire par un mécanisme similaire à celui de l'hémagglutinine du virus de l'influenza dont il est inspiré (Kusumoto et al., 2013).

- **Se doter d'un cœur de nanoparticule plus novateur** que le polyplexe PEI/ADNp. Dans ce sens, la famille des chitosanes (Buschmann et al., 2013) – éventuellement pour la vectorisation de petits ARN interférents – est attractive et présente de fortes analogies de structure qui permettraient un transfert d'expertise plus aisé. D'autres architectures pourraient bénéficier d'un enrobage hydrophile anionique, comme les nanotubes de carbone (Karimi et al., 2015).

•

BIBLIOGRAPHIE

- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., & Fessi, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 58(15), 1688-1713. doi: 10.1016/j.addr.2006.09.017
- Akita, H., Kogure, K., Moriguchi, R., Nakamura, Y., Higashi, T., Nakamura, T., . . . Harashima, H. (2011). Reprint of: Nanoparticles for ex vivo siRNA delivery to dendritic cells for cancer vaccines: Programmed endosomal escape and dissociation. *J. Control. Release*, 149(1), 58-64. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.08.023
- Akita, H., Masuda, T., Nishio, T., Niikura, K., Ijro, K., & Harashima, H. (2011). Improving in Vivo Hepatic Transfection Activity by Controlling Intracellular Trafficking: The Function of GALA and Maltotriose. *Mol. Pharm.*, 8(4), 1436-1442. doi: 10.1021/mp200189s
- Algar, W. R., Prasuhn, D. E., Stewart, M. H., Jennings, T. L., Blanco-Canosa, J. B., Dawson, P. E., & Medintz, I. L. (2011). The controlled display of biomolecules on nanoparticles: a challenge suited to bioorthogonal chemistry. *Bioconjug. Chem.*, 22(5), 825-858. doi: 10.1021/bc200065z
- Almalik, A., Day, P. J., & Tirelli, N. (2013). HA-Coated Chitosan Nanoparticles for CD44-Mediated Nucleic Acid Delivery. *Macromol. Biosci.*, 13(12), 1671-1680. doi: 10.1002/mabi.201300302
- Amoozgar, Z., & Yeo, Y. (2012). Recent advances in stealth coating of nanoparticle drug delivery systems. *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.*, 4(2), 219-233. doi: 10.1002/wnan.1157
- Anchordoquy, T. J., Armstrong, T. K., & Molina, M. d. C. (2005). Low molecular weight dextrans stabilize nonviral vectors during lyophilization at low osmolalities: concentrating suspensions by rehydration to reduced volumes. *J. Pharm. Sci.*, 94(6), 1226-1236. doi: 10.1002/jps.20353
- Anderson, D. G., Akinc, A., Hossain, N., & Langer, R. (2005). Structure/property studies of polymeric gene delivery using a library of poly([beta]-amino esters). *Mol. Ther.*, 11(3), 426-434. doi: 10.1016/j.ymthe.2004.11.015
- Backliwal, G., Hildinger, M., Chenuet, S., Wulhfard, S., De, J. M., & Wurm, F. M. (2008). Rational vector design and multi-pathway modulation of HEK 293E cells yield recombinant antibody titers exceeding 1 g/l by transient transfection under serum-free conditions. *Nucleic Acids Res.*, 36(15), e96. Tiré de PM:18617574
- Bader, A. G. (2012). miR-34 – A microRNA Replacement Therapy Is Headed to the Clinic. *Front. Genet.*, 3. doi: 10.3389/fgene.2012.00120
- Banerjee, D., Liu, A. P., Voss, N. R., Schmid, S. L., & Finn, M. G. (2010). Multivalent display and receptor-mediated endocytosis of transferrin on virus-like particles. *ChemBioChem*, 11(9), 1273-1279. doi: 10.1002/cbic.201000125

- Bartlett, D. W., & Davis, M. E. (2007). Physicochemical and biological characterization of targeted, nucleic acid-containing nanoparticles. *Bioconjug. Chem.*, 18(2), 456-468. doi: 10.1021/bc0603539
- Bartlett, D. W., Su, H., Hildebrandt, I. J., Weber, W. A., & Davis, M. E. (2007). Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality in vivo imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(39), 15549-15554. doi: 10.1073/pnas.0707461104
- Battu, S., Martin, S., & Pespes, G. (Réalisateurs). (2009). Fractionnement par couplage Flux-Force. [slideshow] Tiré de <http://www.g4-f.com/documents/Principe%20techniques%20FFFF-MM-SB-GL.pdf>
- Berger, J., Hauber, J., Hauber, R., Geiger, R., & Cullen, B. R. (1988). Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. *Gene*, 66(1), 1-10. doi: 10.1016/0378-1119(88)90219-3
- Bhise, N. S., Shmueli, R. B., Gonzalez, J., & Green, J. J. (2012). A novel assay for quantifying the number of plasmids encapsulated by polymer nanoparticles. *Small*, 8(3), 367-373. doi: 10.1002/sml.201101718
- Bieber, T., Meissner, W., Kostin, S., Niemann, A., & Elsasser, H. P. (2002). Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes. *J. Control. Release*, 82(2-3), 441-454. doi: 10.1016/S0168-3659(02)00129-3
- Boeckle, S., von Gersdorff, K., van der Piepen, S., Culmsee, C., Wagner, E., & Ogris, M. (2004). Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer. *J. Gene Med.*, 6(10), 1102-1111. doi: 10.1002/jgm.598
- Bolhassani, A. (2011). Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1816(2), 232-246. doi: 10.1016/j.bbcan.2011.07.006
- Boucher, C., Ruiz, J. C., Thibault, M., Buschmann, M. D., Wertheimer, M. R., Jolicoeur, M., . . . De Crescenzo, G. (2010). Human corneal epithelial cell response to epidermal growth factor tethered via coiled-coil interactions. *Biomaterials*, 31(27), 7021-7031. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.05.072
- Boucher, C., St-Laurent, G., Loignon, M., Jolicoeur, M., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2008). The Bioactivity and Receptor Affinity of Recombinant Tagged EGF Designed for Tissue Engineering Applications Is Defined by the Nature and Position of the Tags. *Tissue Eng.*, 14(12), 2069-2077. doi: 10.1089/ten.tea.2008.0037
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., & Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(16), 7297-7301. Tiré de <http://www.pnas.org/content/92/16/7297.full.pdf>
- Brandenburg, B., & Zhuang, X. (2007). Virus trafficking – learning from single-virus tracking. *Nat. Rev. Microbiol.*, 5(3), 197-208. doi: 10.1038/nrmicro1615
- Breuzard, G., Tertilt, M., Goncalves, C., Cheradame, H., Geguan, P., Pichon, C., & Midoux, P. (2008). Nuclear delivery of NFkappaB-assisted DNA/polymer complexes: plasmid DNA

- quantitation by confocal laser scanning microscopy and evidence of nuclear polyplexes by FRET imaging. *Nucleic Acids Res.*, 36(12), e71. doi: 10.1093/nar/gkn287
- Burke, P. A., Pun, S. H., & Reineke, T. M. (2013). Advancing Polymeric Delivery Systems Amidst a Nucleic Acid Therapy Renaissance. *ACS Macro Lett.*, 2(10), 928-934. doi: 10.1021/mz400418j
- Buschmann, M. D., Merzouki, A., Lavertu, M., Thibault, M., Jean, M., & Darras, V. (2013). Chitosans for delivery of nucleic acids. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 65(9), 1234-1270. doi: 10.1016/j.addr.2013.07.005
- Carlsson, J., Drevin, H., & Axen, R. (1978). Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunctional reagent. *Biochem. J.*, 173(3), 723-737. Tiré de <http://www.biochemj.org/bj/173/bj1730723.htm>
- Carnell, P. (2014). Extending the options for particle characterisation. *Metal Powder Report*, 69(3), 22-23. doi: 10.1016/S0026-0657(14)70131-6
- Carpentier, E., Paris, S., Kamen, A. A., & Durocher, Y. (2007). Limiting factors governing protein expression following polyethylenimine-mediated gene transfer in HEK293-EBNA1 cells. *J Biotechnol*, 128(2), 268-280. Tiré de PM:17118475
- Cervera, L., Gutiérrez-Granados, S., Berrow, N. S., de las Mercedes Segura, M., & Gòdia, F. (2014). Extended gene expression by medium exchange and repeated transient transfection for recombinant protein production enhancement. *Biotechnol. Bioeng.* n/a-n/a. doi: 10.1002/bit.25503
- Chang, R. L. S., Crawford, M. P., & West, M. D. (1980). An assessment of the potential use of anionic dextrans as a plasma substitute. *J. Biomed. Engng.*, 2(1), 41-44. doi: 10.1016/0141-5425(80)90090-4
- Chen, X., Kube, D. M., Cooper, M. J., & Davis, P. B. (2007). Cell Surface Nucleolin Serves as Receptor for DNA Nanoparticles Composed of Pegylated Polylysine and DNA. *Mol. Ther.*, 16(2), 333-342. doi: 10.1038/sj.mt.6300365
- Cheng, C. J., & Saltzman, W. M. (2011). Enhanced siRNA delivery into cells by exploiting the synergy between targeting ligands and cell-penetrating peptides. *Biomaterials*, 32(26), 6194-6203. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.04.053
- Cheng, Z., Al Zaki, A., Hui, J. Z., Muzykantov, V. R., & Tsourkas, A. (2012). Multifunctional Nanoparticles: Cost Versus Benefit of Adding Targeting and Imaging Capabilities. *Science*, 338(6109), 903-910. doi: 10.1126/science.1226338
- Chou, S. T., Leng, Q., Scaria, P., Woodle, M., & Mixson, A. J. (2011). Selective modification of HK peptides enhances siRNA silencing of tumor targets in vivo. *Cancer Gene Ther.*, 18(10), 707-716. doi: 10.1038/cgt.2011.40
- Chu, D. S., Johnson, R. N., & Pun, S. H. (2012). Cathepsin B-sensitive polymers for compartment-specific degradation and nucleic acid release. *J. Control. Release*, 157(3), 445-454. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.10.016
- Chu, H., & Wang, Y. (2012). Therapeutic angiogenesis: controlled delivery of angiogenic factors. *Therapeutic delivery*, 3(6), 693-714.

- Chu, Q., Tousignant, J. D., Fang, S., Jiang, C., Eastman, S. J., Chen, L. H., . . . Scheule, R. K. (1999). Binding and Uptake of Cationic Lipid: pDNA Complexes by Polarized Airway Epithelial Cells. *Hum Gene Ther*, 10(1), 25-36. doi: 10.1089/10430349950019165
- Clamme, J. P., Azoulay, J., & Mely, Y. (2003). Monitoring of the formation and dissociation of polyethylenimine/DNA complexes by two photon fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.*, 84(3), 1960-1968. doi: 10.1016/s0006-3495(03)75004-8
- Conner, S. D., & Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422(6927), 37-44. doi: 10.1038/nature01451
- Dash, P. R., Read, M. L., Fisher, K. D., Howard, K. A., Wolfert, M., Oupicky, D., . . . Seymour, L. W. (2000). Decreased binding to proteins and cells of polymeric gene delivery vectors surface modified with a multivalent hydrophilic polymer and retargeting through attachment of transferrin. *J. Biol. Chem.*, 275(6), 3793-3802. doi: 10.1074/jbc.275.6.3793
- Davis, M. E., Zuckerman, J. E., Choi, C. H., Seligson, D., Tolcher, A., Alabi, C. A., . . . Ribas, A. (2010). Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature*, 464(7291), 1067-1070. doi: 10.1038/nature08956
- Dawidczyk, C. M., Kim, C., Park, J. H., Russell, L. M., Lee, K. H., Pomper, M. G., & Searson, P. C. (2014). State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: Lessons from FDA-approved nanomedicines. *J. Control. Release*. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.05.036
- de Bruin, K., Ruthardt, N., von Gersdorff, K., Bausinger, R., Wagner, E., Ogris, M., & Brauchle, C. (2007). Cellular dynamics of EGF receptor-targeted synthetic viruses. *Mol. Ther.*, 15(7), 1297-1305. doi: 10.1038/sj.mt.6300176
- De Crescenzo, G., Litowski, J. R., Hodges, R. S., & O'Connor-McCourt, M. D. (2003). Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de Novo Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding. *Biochemistry*, 42 1754-1763. doi: 10.1021/bi0268450
- De Crescenzo, G., Pham, P. L., Durocher, Y., & O'Connor-McCourt, M. D. (2003). Transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding to the extracellular domain of the type II TGF-beta receptor: receptor capture on a biosensor surface using a new coiled-coil capture system demonstrates that avidity contributes significantly to high affinity binding. *J. Mol. Biol.*, 328(5), 1173-1183. doi: 10.1016/S0022-2836(03)00360-7
- De Smedt, S. C., Demeester, J., & Hennink, W. E. (2000). Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharm. Res.*, 17(2), 113-126. doi: 10.1023/A:1007548826495
- Ding, H., Portilla-Arias, J., Patil, R., Black, K. L., Ljubimova, J. Y., & Holler, E. (2013). Distinct mechanisms of membrane permeation induced by two polymeric acid copolymers. *Biomaterials*, 34(1), 217-225. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.08.016
- Drake, D. M., & Pack, D. W. (2008). Biochemical investigation of active intracellular transport of polymeric gene-delivery vectors. *J.Pharm.Sci.*, 97(4), 1399-1413. Tiré de PM:17712850
- Drogoz, A., David, L., Rochas, C., Domard, A., & Delair, T. (2007). Polyelectrolyte complexes from polysaccharides: formation and stoichiometry monitoring. *Langmuir*, 23(22), 10950-10958. doi: 10.1021/la7008545

- Durocher, Y., & Butler, M. (2009). Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr. Opin. Biotech.*, 20 700-707. doi: 10.1016/j.copbio.2009.10.008
- Durocher, Y., Perret, S., & Kamen, A. (2002). High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res.*, 30(2), E9. doi: 10.1093/nar/30.2.e9
- Dvir, T., Banghart, M. R., Timko, B. P., Langer, R., & Kohane, D. S. (2010). Photo-targeted nanoparticles. *Nano Lett.*, 10(1), 250-254. doi: 10.1021/nl903411s
- Ehrhardt, C., Schmolke, M., Matzke, A., Knoblauch, A., Will, C., Wixler, V., & Ludwig, S. (2006). Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent. *Signal Transduction*, 6(3), 179-184. doi: 10.1002/sita.200500073
- Erbacher, P., Bettinger, T., Belguise-Valladier, P., Zou, S., Coll, J. L., Behr, J. P., & Remy, J. S. (1999). Transfection and physical properties of various saccharide, poly(ethylene glycol), and antibody-derivatized polyethylenimines (PEI). *J. Gene Med.*, 1(3), 210-222. doi: 10.1002/(sici)1521-2254(199905/06)1:3<210::aid-jgm30>3.0.co;2-u
- Fakhari, A., Baoum, A., Siahaan, T. J., Le, K. B., & Berkland, C. (2011). Controlling ligand surface density optimizes nanoparticle binding to ICAM-1. *J. Pharm. Sci.*, 100(3), 1045-1056. doi: 10.1002/jps.22342
- Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2009). Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *ACS Nano*, 3(1), 16-20. doi: 10.1021/nn900002m
- Fella, C., Walker, G. F., Ogris, M., & Wagner, E. (2008). Amine-reactive pyridylhydrazone-based PEG reagents for pH-reversible PEI polyplex shielding. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 34(4-5), 309-320. doi: 10.1016/j.ejps.2008.05.004
- Fitzsimmons, R. E., & Uludag, H. (2012). Specific effects of PEGylation on gene delivery efficacy of polyethylenimine: interplay between PEG substitution and N/P ratio. *Acta Biomater.*, 8(11), 3941-3955. doi: 10.1016/j.actbio.2012.07.015
- Fleige, E., Quadir, M. A., & Haag, R. (2012). Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for the controlled transport of active compounds: Concepts and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 64(9), 866-884. doi: 10.1016/j.addr.2012.01.020
- Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R., Rall, G. F., & Skalka, A.-M. (2008). *Principles of Virology* (3rd^e éd.): Garland Science.
- Fortier, C., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2013). A versatile coiled-coil tethering system for the oriented display of ligands on nanocarriers for targeted gene delivery. *Biomaterials*, 34(4), 1344-1353. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.047
- Fortier, C., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2014). Surface modification of non-viral nanocarriers for enhanced gene delivery. *Nanomedicine*, 9(1), 135-151. doi: 10.2217/nnm.13.194
- Gaber, B. P. (1998). 1998 Molecular Graphics Art Show. Tiré de http://mgl.scripps.edu/people/goodsell/mgs_art/mgs_art2/gaber2.html
- Gajbhiye, V., & Gong, S. (2013). Lectin functionalized nanocarriers for gene delivery. *Biotechnol. Adv.*, 31(5), 552-562. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.01.005

- Geisse, S. (2009). Reflections on more than 10 years of TGE approaches. *Protein Expr. Purif.*, 64(2), 99-107. doi: 10.1016/j.pep.2008.10.017
- Gilleron, J., Querbes, W., Zeigerer, A., Borodovsky, A., Marsico, G., Schubert, U., . . . Zerial, M. (2013). Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape. *Nat. Biotechnol.*, 31(7), 638-646. doi: 10.1038/nbt.2612
- Glover, D. J., Lipps, H. J., & Jans, D. A. (2005). Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat. Rev. Genet.*, 6(4), 299-310. doi: 10.1038/nrg1577
- Goula, D., Benoist, C., Mantero, S., Merlo, G., Levi, G., & Demeneix, B. (1998). Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung. *Gene Ther.*, 5(9), 1291-1295. Tiré de <http://www.nature.com/gt/journal/v5/n9/abs/3300717a.html>
- Grayson, A. C., Doody, A. M., & Putnam, D. (2006). Biophysical and structural characterization of polyethylenimine-mediated siRNA delivery in vitro. *Pharm. Res.*, 23(8), 1868-1876. doi: 10.1007/s11095-006-9009-2
- Hacker, D. L., Kiseljak, D., Rajendra, Y., Thurnheer, S., Baldi, L., & Wurm, F. M. (2013). Polyethyleneimine-based transient gene expression processes for suspension-adapted HEK-293E and CHO-DG44 cells. *Protein Expr. Purif.*, 92(1), 67-76. doi: 10.1016/j.pep.2013.09.001
- Haigler, H., Ash, J. F., Singer, S. J., & Cohen, S. (1978). Visualization by fluorescence of the binding and internalization of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75(7), 3317-3321. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC392766/pdf/pnas00019-0313.pdf>
- Harris, T. J., Green, J. J., Fung, P. W., Langer, R., Anderson, D. G., & Bhatia, S. N. (2010). Tissue-specific gene delivery via nanoparticle coating. *Biomaterials*, 31(5), 998-1006. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.10.012
- Hatakeyama, H., Akita, H., & Harashima, H. (2011). A multifunctional envelope type nano device (MEND) for gene delivery to tumours based on the EPR effect: a strategy for overcoming the PEG dilemma. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 63(3), 152-160. doi: 10.1016/j.addr.2010.09.001
- Hattori, Y., Yamasaku, H., & Maitani, Y. (2013). Anionic polymer-coated lipoplex for safe gene delivery into tumor by systemic injection. *J. Drug Target.*, 21(7), 639-647. doi: 10.3109/1061186x.2013.789035
- Heidel, J. D., & Davis, M. E. (2011). Clinical developments in nanotechnology for cancer therapy. *Pharm. Res.*, 28(2), 187-199. doi: 10.1007/s11095-010-0178-7
- Heinze, T., Liebert, T., Heublein, B., & Hornig, S. (2006). Functional Polymers Based on Dextran. Dans D. Klemm (Édit.), *Polysaccharides II* (vol. 205, p. 199-291): Springer Berlin Heidelberg.
- Herweijer, H., & Wolff, J. A. (2006). Gene therapy progress and prospects: Hydrodynamic gene delivery. *Gene Ther.*, 14(2), 99-107. doi: 10.1038/sj.gt.3302891
- Höbel, S., & Aigner, A. (2013). Polyethylenimines for siRNA and miRNA delivery in vivo. *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.*, 5(5), 484-501. doi: 10.1002/wnan.1228

- Honig, D., DeRouchey, J., Jungmann, R., Koch, C., Plank, C., & Radler, J. O. (2010). Biophysical characterization of copolymer-protected gene vectors. *Biomacromolecules*, *11*(7), 1802-1809. doi: 10.1021/bm1002569
- Hornof, M., de la Fuente, M., Hallikainen, M., Tammi, R. H., & Urtti, A. (2008). Low molecular weight hyaluronan shielding of DNA/PEI polyplexes facilitates CD44 receptor mediated uptake in human corneal epithelial cells. *J. Gene Med.*, *10*(1), 70-80. doi: 10.1002/jgm.1125
- Hu, C.-M. J., Zhang, L., Aryal, S., Cheung, C., Fang, R. H., & Zhang, L. (2011). Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *108*(27), 10980-10985. doi: 10.1073/pnas.1106634108
- Huang, Y., Jiang, Y., Wang, H., Wang, J., Shin, M. C., Byun, Y., . . . Yang, V. C. (2013). Curb challenges of the "Trojan Horse" approach: Smart strategies in achieving effective yet safe cell-penetrating peptide-based drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, *65*(10), 1299-1315. doi: 10.1016/j.addr.2012.11.007
- Ishitsuka, T., Akita, H., & Harashima, H. (2011). Functional improvement of an IRQ-PEG-MEND for delivering genes to the lung. *J. Control. Release*, *154*(1), 77-83. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.05.012
- Itaka, K., & Kataoka, K. (2009). Recent development of nonviral gene delivery systems with virus-like structures and mechanisms. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, *71*(3), 475-483. doi: 10.1016/j.ejpb.2008.09.019
- Ito, T., Yoshihara, C., Hamada, K., & Koyama, Y. (2010). DNA/polyethyleneimine/hyaluronic acid small complex particles and tumor suppression in mice. *Biomaterials*, *31*(10), 2912-2918. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.12.032
- Jain, S., Kumar, S., Agrawal, A. K., Thanki, K., & Banerjee, U. C. (2013). Enhanced transfection efficiency and reduced cytotoxicity of novel lipid-polymer hybrid nanoplexes. *Mol. Pharm.*, *10*(6), 2416-2425. doi: 10.1021/mp400036w
- Jiang, D., & Salem, A. K. (2012). Optimized dextran–polyethylenimine conjugates are efficient non-viral vectors with reduced cytotoxicity when used in serum containing environments. *Int. J. Pharm.*, *427*(1), 71-79. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.10.032
- Jiang, S., & Nail, S. L. (1998). Effect of process conditions on recovery of protein activity after freezing and freeze-drying. *European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceutics*, *45*(3), 249-257. doi: 10.1016/S0939-6411(98)00007-1
- Jing, F., Li, J., Liu, D., Wang, C., & Sui, Z. (2013). Dual ligands modified double targeted nano-system for liver targeted gene delivery. *Pharm. Biol.*, *51*(5), 643-649. doi: 10.3109/13880209.2012.761245
- Jokerst, J. V., Lobovkina, T., Zare, R. N., & Gambhir, S. S. (2011). Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine*, *6*(4), 715-728. doi: 10.2217/nnm.11.19
- Karimi, M., Solati, N., Ghasemi, A., Estiar, M. A., Hashemkhani, M., Kiani, P., . . . Hamblin, M. R. (2015). Carbon nanotubes part II: a remarkable carrier for drug and gene delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.*, *0*(0), 1-17. doi: 10.1517/17425247.2015.1004309

- Kasper, J. C., Troiber, C., Kuchler, S., Wagner, E., & Friess, W. (2013). Formulation development of lyophilized, long-term stable siRNA/oligoaminoamide polyplexes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 85(2), 294-305. doi: 10.1016/j.ejpb.2013.05.010
- Khan, M., Ong, Z. Y., Wiradharma, N., Attia, A. B., & Yang, Y. Y. (2012). Advanced materials for co-delivery of drugs and genes in cancer therapy. *Adv. Healthc. Mater.*, 1(4), 373-392. doi: 10.1002/adhm.201200109
- Kichler, A., Leborgne, C., & Danos, O. (2005). Dilution of reporter gene with stuffer DNA does not alter the transfection efficiency of polyethylenimines. *J. Gene Med.*, 7(11), 1459-1467. doi: 10.1002/jgm.805
- Kickhoefer, V. A., Han, M., Raval-Fernandes, S., Poderycki, M. J., Moniz, R. J., Vaccari, D., . . . Rome, L. H. (2008). Targeting Vault Nanoparticles to Specific Cell Surface Receptors. *ACS Nano*, 3(1), 27-36. doi: 10.1021/nn800638x
- Kim, C. H., Axup, J. Y., & Schultz, P. G. (2013). Protein conjugation with genetically encoded unnatural amino acids. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 17(3), 412-419. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.04.017
- Kim, I.-Y., Kang, Y.-S., Lee, D. S., Park, H.-J., Choi, E.-K., Oh, Y.-K., . . . Kim, J., -S. (2009). Antitumor activity of EGFR targeted pH-sensitive immunoliposomes encapsulating gemcitabine in A549 xenograft nude mice. *J. Control. Release*, 140(1), 55-60. doi: 10.1016/j.jconrel.2009.07.005
- Kim, J. S., Oh, M. H., Park, J. Y., Park, T. G., & Nam, Y. S. (2013). Protein-resistant, reductively dissociable polyplexes for in vivo systemic delivery and tumor-targeting of siRNA. *Biomaterials*, 34(9), 2370-2379. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.12.004
- Kluza, E., van der Schaft, D. W. J., Hautvast, P. A. I., Mulder, W. J. M., Mayo, K. H., Griffioen, A. W., . . . Nicolay, K. (2010). Synergistic Targeting of alphavbeta3 Integrin and Galectin-1 with Heteromultivalent Paramagnetic Liposomes for Combined MR Imaging and Treatment of Angiogenesis. *Nano Lett.*, 10(1), 52-58. doi: 10.1021/nl902659g
- Krentsel, L., Chaubet, F., Rebrov, A., Champion, J., Ermakov, I., Bittoun, P., . . . Jozefonvicz, J. (1997). Anticoagulant activity of functionalized dextrans. Structure analyses of carboxymethylated dextran and first Monte Carlo simulations. *Carbohydr. Polym.*, 33(1), 63-71. doi: 10.1016/S0144-8617(96)00173-7
- Kuai, R., Yuan, W., Li, W., Qin, Y., Tang, J., Yuan, M., . . . He, Q. (2011). Targeted delivery of cargoes into a murine solid tumor by a cell-penetrating peptide and cleavable poly(ethylene glycol) comodified liposomal delivery system via systemic administration. *Mol. Pharm.*, 8(6), 2151-2161. doi: 10.1021/mp200100f
- Kurosaki, T., Higuchi, N., Kawakami, S., Higuchi, Y., Nakamura, T., Kitahara, T., . . . Sasaki, H. (2012). Self-assemble gene delivery system for molecular targeting using nucleic acid aptamer. *Gene*, 491(2), 205-209. doi: 10.1016/j.gene.2011.09.021
- Kurosaki, T., Kitahara, T., Fumoto, S., Nishida, K., Nakamura, J., Niidome, T., . . . Sasaki, H. (2009). Ternary complexes of pDNA, polyethylenimine, and gamma-polyglutamic acid for gene delivery systems. *Biomaterials*, 30(14), 2846-2853. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.01.055

- Kurosaki, T., Kitahara, T., Kawakami, S., Nishida, K., Nakamura, J., Teshima, M., . . . Sasaki, H. (2009). The development of a gene vector electrostatically assembled with a polysaccharide capsule. *Biomaterials*, 30(26), 4427-4434. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.04.041
- Kusumoto, K., Akita, H., Ishitsuka, T., Matsumoto, Y., Nomoto, T., Furukawa, R., . . . Harashima, H. (2013). A Lipid Envelope-Type Nano Particle Incorporating a Multifunctional Peptide for the Systemic siRNA Delivery to the Pulmonary Endothelium. *ACS Nano*, 7(9), 7534-7541. doi: 10.1021/nn401317t
- Laga, R., Carlisle, R., Tangney, M., Ulbrich, K., & Seymour, L. W. (2012). Polymer coatings for delivery of nucleic acid therapeutics. *J. Control. Release*, 161(2), 537-553. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.02.013
- Lammers, T., Kiessling, F., Hennink, W. E., & Storm, G. (2012). Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *J. Control. Release*, 161(2), 175-187. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.09.063
- Lee, H., Lytton-Jean, A. K., Chen, Y., Love, K. T., Park, A. I., Karagiannis, E. D., . . . Anderson, D. G. (2012). Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted in vivo siRNA delivery. *Nat. Nano.*, 7(6), 389-393. doi: 10.1038/nnano.2012.73
- Lee, L. K., Williams, C. L., Devore, D., & Roth, C. M. (2006). Poly(propylacrylic acid) enhances cationic lipid-mediated delivery of antisense oligonucleotides. *Biomacromolecules*, 7(5), 1502-1508. doi: 10.1021/bm060114o
- Lee, Y., Ishii, T., Kim, H. J., Nishiyama, N., Hayakawa, Y., Itaka, K., & Kataoka, K. (2010). Efficient Delivery of Bioactive Antibodies into the Cytoplasm of Living Cells by Charge-Conversional Polyion Complex Micelles. *Angew Chem-Int Edit*, 49(14), 2552-2555. doi: 10.1002/anie.200905264
- Lehtinen, J., Hyvonen, Z., Subrizi, A., Bunjes, H., & Urtti, A. (2008). Glycosaminoglycan-resistant and pH-sensitive lipid-coated DNA complexes produced by detergent removal method. *J. Control. Release*, 131(2), 145-149. doi: 10.1016/j.jconrel.2008.07.018
- Leng, Q., & Mixson, A. J. (2005). Modified branched peptides with a histidine-rich tail enhance in vitro gene transfection. *Nucleic Acids Res.*, 33(4), e40. doi: 10.1093/nar/gni040
- Levitzki, A., & Gazit, A. (1995). Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science*, 267(5205), 1782-1788. doi: 10.1126/science.7892601
- Li, P., Liu, D., Miao, L., Liu, C., Sun, X., Liu, Y., & Zhang, N. (2012). A pH-sensitive multifunctional gene carrier assembled via layer-by-layer technique for efficient gene delivery. *Int. J. Nanomed.*, 7 925-939. doi: 10.2147/ijn.s26955
- Liao, Z. X., Peng, S. F., Ho, Y. C., Mi, F. L., Maiti, B., & Sung, H. W. (2012). Mechanistic study of transfection of chitosan/DNA complexes coated by anionic poly(gamma-glutamic acid). *Biomaterials*, 33(11), 3306-3315. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.01.013
- Liberelle, B., Bartholin, L., Boucher, C., Murschel, F., Jolicoeur, M., Durocher, Y., . . . De Crescenzo, G. (2010). New ELISA approach based on coiled-coil interactions. *J. Immunol. Methods*, 362(1-2), 161-167. doi: 10.1016/j.jim.2010.09.027

- Liberelle, B., Merzouki, A., & De Crescenzo, G. (2013). Immobilized carboxymethylated dextran coatings for enhanced ELISA. *J. Immunol. Methods*, 389(1–2), 38–44. doi: 10.1016/j.jim.2012.12.007
- Liu, C., Liu, F., Feng, L., Li, M., Zhang, J., & Zhang, N. (2013). The targeted co-delivery of DNA and doxorubicin to tumor cells via multifunctional PEI-PEG based nanoparticles. *Biomaterials*, 34(10), 2547–2564. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.12.038
- Liu, M., Li, Z. H., Xu, F. J., Lai, L. H., Wang, Q. Q., Tang, G. P., & Yang, W. T. (2011). An oligopeptide ligand-mediated therapeutic gene nanocomplex for liver cancer-targeted therapy. *Biomaterials*. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.11.082
- Louvier, E. (2015). *Conception et évaluation d'un nouveau système de transfection ciblée, basé sur l'utilisation du système E/Kcoil*. (monograph, Université de Montréal, Montréal).
- Lungwitz, U., Breunig, M., Blunk, T., & Gopferich, A. (2005). Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 60(2), 247–266. doi: 10.1016/j.ejpb.2004.11.011
- Ma, P., Dong, X., Swadley, C. L., Gupte, A., Leggas, M., Ledebur, H. C., & Mumper, R. J. (2009). Development of Idarubicin and Doxorubicin Solid Lipid Nanoparticles to Overcome Pgp-mediated Multiple Drug Resistance in Leukemia. *J. Biomed. Nanotechnol.*, 5(2), 151–161. doi: 10.1166/jbn.2009.1021
- Ma, P. L., Buschmann, M. D., & Winnik, F. M. (2010). One-Step Analysis of DNA/Chitosan Complexes by Field-Flow Fractionation Reveals Particle Size and Free Chitosan Content. *Biomacromolecules*, 11(3), 549–554. doi: 10.1021/bm901345q
- Ma, P. L., Lavertu, M., Winnik, F. M., & Buschmann, M. D. (2009). New Insights into Chitosan–DNA Interactions Using Isothermal Titration Microcalorimetry. *Biomacromolecules*, 10(6), 1490–1499. doi: 10.1021/bm900097s
- Maeda, H., Nakamura, H., & Fang, J. (2012). The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 65(1), 71–79. doi: 10.1016/j.addr.2012.10.002
- Mandal, B., Bhattacharjee, H., Mittal, N., Sah, H., Balabathula, P., Thoma, L. A., & Wood, G. C. (2013). Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. *Nanomed.-Nanotechnol.*, 9(4), 474–491. doi: 10.1016/j.nano.2012.11.010
- Manders, E. M., Stap, J., Brakenhoff, G. J., van Driel, R., & Aten, J. A. (1992). Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J. Cell. Sci.*, 103 (Pt 3) 857–862. Tiré de <http://jcs.biologists.org/content/103/3/857.short>
- Manders, E. M. M., Verbeek, F. J., & Aten, J. A. (1993). Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J. Microsc.*, 169(3), 375–382. doi: 10.1111/j.1365-2818.1993.tb03313.x
- Mao, S., Neu, M., Gernershaus, O., Merkel, O., Sitterberg, J., Bakowsky, U., & Kissel, T. (2006). Influence of polyethylene glycol chain length on the physicochemical and biological properties of poly(ethylene imine)-graft-poly(ethylene glycol) block

- copolymer/SiRNA polyplexes. *Bioconjug. Chem.*, 17(5), 1209-1218. doi: 10.1021/bc060129j
- Martens, T. F., Remaut, K., Deschout, H., Engbersen, J. F. J., Hennink, W. E., van Steenberghe, M. J., . . . Braeckmans, K. (2015). Coating nanocarriers with hyaluronic acid facilitates intravitreal drug delivery for retinal gene therapy. *J. Controlled Release*, 202(0), 83-92. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.01.030
- Marti, U., Burwen, S. J., Wells, A., Barker, M. E., Huling, S., Feren, A. M., & Jones, A. L. (1991). Localization of epidermal growth factor receptor in hepatocyte nuclei. *Hepatology*, 13(1), 15-20. doi: 10.1002/hep.1840130104
- Master, A. M., & Sen Gupta, A. (2012). EGF receptor-targeted nanocarriers for enhanced cancer treatment. *Nanomedicine*, 7(12), 1895-1906. doi: 10.2217/nnm.12.160
- Masters, K. S. (2011). Covalent growth factor immobilization strategies for tissue repair and regeneration. *Macromol. Biosci.*, 11(9), 1149-1163. doi: 10.1002/mabi.201000505
- Midoux, P., Breuzard, G., Gomez, J. P., & Pichon, C. (2008). Polymer-based gene delivery: a current review on the uptake and intracellular trafficking of polyplexes. *Curr. Gene Ther.*, 8(5), 335-352. doi: 10.2174/156652308786071014
- Mintzer, M. A., & Simanek, E. E. (2009). Nonviral vectors for gene delivery. *Chem. Rev.*, 109(2), 259-302. doi: 10.1021/cr800409e
- Mishra, S., Peddada, L. Y., Devore, D., & Roth, C. M. (2012). Poly(alkylene oxide) Copolymers for Nucleic Acid Delivery. *Accounts Chem. Res.*, 45(7), 1057-1066. doi: 10.1021/ar200232n
- Miyajima, T., Yoshida, K., & Högfeldt, E. (1993). Polyelectrolyte Titrations. The System Na⁺-H⁺ on Carboxymethyldextran. *J. Colloid Interface Sci.*, 156(2), 383-387. doi: 10.1006/jcis.1993.1126
- Mizrahy, S., & Peer, D. (2012). Polysaccharides as building blocks for nanotherapeutics. *Chem. Soc. Rev.*, 41(7), 2623-2640. doi: 10.1039/c1cs15239d
- Mizrahy, S., Raz, S. R., Hasgaard, M., Liu, H., Soffer-Tsur, N., Cohen, K., . . . Peer, D. (2011). Hyaluronan-coated nanoparticles: The influence of the molecular weight on CD44-hyaluronan interactions and on the immune response. *J. Control. Release*, 156(2), 231-238. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.06.031
- Moore, A., Weissleder, R., & Bogdanov, A., Jr. (1997). Uptake of dextran-coated monocrystalline iron oxides in tumor cells and macrophages. *J. Magn. Reson. Imaging*, 7(6), 1140-1145. doi: 10.1002/jmri.1880070629
- Moore, N. M., Sheppard, C. L., Barbour, T. R., & Sakiyama-Elbert, S. E. (2008). The effect of endosomal escape peptides on in vitro gene delivery of polyethylene glycol-based vehicles. *J. Gene Med.*, 10(10), 1134-1149. doi: 10.1002/jgm.1234
- Morpurgo, M., Veronese, F. M., Kachensky, D., & Harris, J. M. (1996). Preparation and Characterization of Poly(ethylene glycol) Vinyl Sulfone. *Bioconjug Chem*, 7(3), 363-368. doi: 10.1021/bc9600224

- Moss, A. J., Sharma, S., & Brindle, N. P. (2009). Rational design and protein engineering of growth factors for regenerative medicine and tissue engineering. *Biochem. Soc. Trans.*, 37(Pt 4), 717-721. doi: BST0370717 [pii]
10.1042/BST0370717
- Mueller, C., & Flotte, T. R. (2008). Clinical gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene therapy*, 15(11), 858-863. doi: 10.1038/gt.2008.68
- Murschel, F., Liberelle, B., St-Laurent, G., Jolicoeur, M., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2013). Coiled-coil-mediated grafting of bioactive vascular endothelial growth factor. *Acta Biomater.*, 9(6), 6806-6813. doi: 10.1016/j.actbio.2013.02.032
- Muthu, M. S., & Singh, S. (2009). Targeted nanomedicines: effective treatment modalities for cancer, AIDS and brain disorders. *Nanomedicine*, 4(1), 105-118. doi: 10.2217/17435889.4.1.105
- Muyldermans, S. (2001). Single domain camel antibodies: current status. *Rev. Mol. Biotechnol.*, 74(4), 277-302. doi: 10.1016/S1389-0352(01)00021-6
- Nakamura, K., Yamashita, K., Itoh, Y., Yoshino, K., Nozawa, S., & Kasukawa, H. (2012). Comparative studies of polyethylene glycol-modified liposomes prepared using different PEG-modification methods. *Biochim. Biophys. Acta*, 1818(11), 2801-2807. doi: 10.1016/j.bbamem.2012.06.019
- Nanosight. (2009). Applications of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) in Nanoparticle Research. *Nanosight Ltd*(M1 10B), 11. Tiré de http://www.nanosight.com/uploads/M110B_Application_Review_NTA_April_2009.pdf
- Nel, A. E., Madler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M., Somasundaran, P., . . . Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.*, 8(7), 543-557. doi: 10.1038/nmat2442
- Ng, Q. K. T., Sutton, M. K., Soonsawad, P., Xing, L., Cheng, H., & Segura, T. (2009). Engineering Clustered Ligand Binding Into Nonviral Vectors: [alpha]v[beta]3 Targeting as an Example. *Mol. Ther.*, 17(5), 828-836. doi: 10.1038/mt.2009.11
- Nguyen, D. N., Green, J. J., Chan, J. M., Langer, R., & Anderson, D. G. (2009). Polymeric Materials for Gene Delivery and DNA Vaccination. *Adv. Mater.*, 21(8), 847-867. doi: 10.1002/adma.200801478
- Niebel, Y., Buschmann, M. D., Lavertu, M., & De Crescenzo, G. (2014). Combined Analysis of Polycation/ODN Polyplexes by Analytical Ultracentrifugation and Dynamic Light Scattering Reveals their Size, Refractive Index Increment, Stoichiometry, Porosity, and Molecular Weight. *Biomacromolecules*, 15(3), 940-947. doi: 10.1021/bm4018148
- Niidome, T., Ohmori, N., Ichinose, A., Wada, A., Mihara, H., Hirayama, T., & Aoyagi, H. (1997). Binding of cationic alpha-helical peptides to plasmid DNA and their gene transfer abilities into cells. *J. Biol. Chem.*, 272(24), 15307-15312. doi: 10.1074/jbc.272.24.15307
- Ning, S., Huang, Q., Sun, X., Li, C., Zhang, Y., Li, J., & Liu, Y. (2011). Carboxymethyl dextran-coated liposomes: Toward a robust drug delivery platform. *Soft Matter*, 7(19), 9394-9401. doi: 10.1039/C1SM05814B

- Nishiyama, N., Iriyama, A., Jang, W. D., Miyata, K., Itaka, K., Inoue, Y., . . . Kataoka, K. (2005). Light-induced gene transfer from packaged DNA enveloped in a dendrimeric photosensitizer. *Nat. Mater.*, 4(12), 934-941. doi: 10.1038/nmat1524
- OCDE. (2005). *Cadre pour les statistiques de biotechnologie* (Rapport n° DSTI/EAS/STP/NESTI(2005)8/FINAL). OECD. Tiré de <http://www.oecd.org/sti/inno/34935605.pdf>
- Ogris, M. (2010). Nucleic acid therapeutics: concepts for targeted delivery to solid tumors. *Ther. Deliv.*, 1(1), 91-107. doi: 10.4155/tde.10.9
- Ogris, M., Brunner, S., Schuller, S., Kircheis, R., & Wagner, E. (1999). PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther.*, 6(4), 595-605. doi: 10.1038/sj.gt.3300900
- Ogris, M., Steinlein, P., Kurs, M., Mechtler, K., Kircheis, R., & Wagner, E. (1998). The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther.*, 5(10), 1425-1433. doi: 10.1038/sj.gt.3300745
- Oupicky, D., Ogris, M., Howard, K. A., Dash, P. R., Ulbrich, K., & Seymour, L. W. (2002). Importance of lateral and steric stabilization of polyelectrolyte gene delivery vectors for extended systemic circulation. *Mol. Ther.*, 5(4), 463-472. doi: 10.1006/mthe.2002.0568
- Pack, D. W., Hoffman, A. S., Pun, S., & Stayton, P. S. (2005). Design and development of polymers for gene delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 4(7), 581-593. doi: 10.1038/nrd1775
- Palumbo, R. N., Zhong, X., & Wang, C. (2012). Polymer-mediated DNA vaccine delivery via bystander cells requires a proper balance between transfection efficiency and cytotoxicity. *J. Control. Release*, 157(1), 86-93. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.08.037
- Patnaik, S., & Gupta, K. C. (2013). Novel polyethylenimine-derived nanoparticles for in vivo gene delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 10(2), 215-228. doi: 10.1517/17425247.2013.744964
- Pechar, M., & Pola, R. (2012). The coiled coil motif in polymer drug delivery systems. *Biotechnol. Adv.*, 31(1), 90-96. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.003
- Peeters, L., Sanders, N. N., Jones, A., Demeester, J., & De Smedt, S. C. (2007). Post-pegylated lipoplexes are promising vehicles for gene delivery in RPE cells. *J. Control. Release*, 121(3), 208-217. doi: 10.1016/j.jconrel.2007.05.033
- Perevyazko, I. Y., Bauer, M., Pavlov, G. M., Hoeppener, S., Schubert, S., Fischer, D., & Schubert, U. S. (2012). Polyelectrolyte complexes of DNA and linear PEI: formation, composition and properties. *Langmuir*, 28(46), 16167-16176. doi: 10.1021/la303094b
- Pham, P. L., Kamen, A., & Durocher, Y. (2006). Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein. *Mol Biotechnol*, 34(2), 225-237. doi: MB:34:2:225
- Pham, P. L., Perret, S., Cass, B., Carpentier, E., St-Laurent, G., Bisson, L., . . . Durocher, Y. (2005). Transient gene expression in HEK293 cells: peptone addition posttransfection improves recombinant protein synthesis. *Biotechnol. Bioeng.*, 90(3), 332-344. doi: 10.1002/bit.20428

- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., & Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, *111*(2), 229-233. doi: 10.1016/0378-1119(92)90691-H
- Pustynnikov, S., Sagar, D., Jain, P., & Khan, Z. K. (2014). Targeting the C-type lectins-mediated host-pathogen interactions with dextran. *J Pharm Pharm Sci*, *17*(3), 371-392.
- Racaniello, V. (2011). Are all virus particles infectious? Tiré de <http://www.virology.ws/2011/01/21/are-all-virus-particles-infectious/>
- Raemdonck, K., Martens, T. F., Braeckmans, K., Demeester, J., & De Smedt, S. C. (2013). Polysaccharide-based nucleic acid nanoformulations. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, *65*(9), 1123-1147. doi: 10.1016/j.addr.2013.05.002
- Raemdonck, K., Naeye, B., Buyens, K., Vandenbroucke, R. E., Høgset, A., Demeester, J., & De Smedt, S. C. (2009). Biodegradable Dextran Nanogels for RNA Interference: Focusing on Endosomal Escape and Intracellular siRNA Delivery. *Adv. Funct. Mater.*, *19*(9), 1406-1415. doi: 10.1002/adfm.200801795
- Rajendra, Y., Kiseljak, D., Baldi, L., Hacker, D. L., & Wurm, F. M. (2015). Transcriptional and post-transcriptional limitations of high-yielding, PEI-mediated transient transfection with CHO and HEK-293E cells. *Biotechnol. Prog.* n/a-n/a. doi: 10.1002/btpr.2064
- Richard, I., Thibault, M., De Crescenzo, G., Buschmann, M. D., & Lavertu, M. (2013). Ionization Behavior of Chitosan and Chitosan–DNA Polyplexes Indicate That Chitosan Has a Similar Capability to Induce a Proton-Sponge Effect as PEI. *Biomacromolecules*, *14*(6), 1732-1740. doi: 10.1021/bm4000713
- Roepstorff, K., Grandal, M. V., Henriksen, L., Knudsen, S. L., Lerdrup, M., Grovdal, L., . . . van Deurs, B. (2009). Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *10*(8), 1115-1127. doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00943.x
- Romberg, B., Oussoren, C., Snel, C. J., Carstens, M. G., Hennink, W. E., & Storm, G. (2007). Pharmacokinetics of poly(hydroxyethyl-L-asparagine)-coated liposomes is superior over that of PEG-coated liposomes at low lipid dose and upon repeated administration. *Biochim. Biophys. Acta*, *1768*(3), 737-743. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.12.005
- Rombouts, K., Martens, T. F., Zagato, E., Demeester, J., De Smedt, S. C., Braeckmans, K., & Remaut, K. (2014). Effect of Covalent Fluorescence Labeling of Plasmid DNA on Its Intracellular Processing and Transfection with Lipid-Based Carriers. *Mol. Pharm.* doi: 10.1021/mp4003078
- Roy, R., Jerry, D. J., & Thayumanavan, S. (2009). Virus-inspired approach to nonviral gene delivery vehicles. *Biomacromolecules*, *10*(8), 2189-2193. doi: 10.1021/bm900370p
- Russ, V., Frohlich, T., Li, Y., Halama, A., Ogris, M., & Wagner, E. (2010). Improved in vivo gene transfer into tumor tissue by stabilization of pseudodendritic oligoethylenimine-based polyplexes. *J. Gene Med.*, *12*(2), 180-193. doi: 10.1002/jgm.1430
- Said Hassane, F., Saleh, A. F., Abes, R., Gait, M. J., & Lebleu, B. (2010). Cell penetrating peptides: overview and applications to the delivery of oligonucleotides. *Cell Mol. Life Sci.*, *67*(5), 715-726. doi: 10.1007/s00018-009-0186-0

- Sakae, M., Ito, T., Yoshihara, C., Iida-Tanaka, N., Yanagie, H., Eriguchi, M., & Koyama, Y. (2008). Highly efficient in vivo gene transfection by plasmid/PEI complexes coated by anionic PEG derivatives bearing carboxyl groups and RGD peptide. *Biomed. Pharmacother.*, 62(7), 448-453. doi: 10.1016/j.biopha.2007.12.009
- Salvati, A., Pitek, A. S., Monopoli, M. P., Prapainop, K., Bombelli, F. B., Hristov, D. R., . . . Dawson, K. A. (2013). Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nat. Nano.*, 8(2), 137-143. doi: 10.1038/nnano.2012.237
- Sawant, R. R., Sriraman, S. K., Navarro, G., Biswas, S., Dalvi, R. A., & Torchilin, V. P. (2012). Polyethyleneimine-lipid conjugate-based pH-sensitive micellar carrier for gene delivery. *Biomaterials*, 33(15), 3942-3951. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.11.088
- Schäfer, A., Pahnke, A., Schaffert, D., van Weerden, W. M., de Ridder, C. M., Rodl, W., . . . Ogris, M. (2011). Disconnecting the Yin and Yang Relation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-Mediated Delivery: A Fully Synthetic, EGFR-Targeted Gene Transfer System Avoiding Receptor Activation. *Hum. Gene Ther.*, 22 1463-1473. doi: 10.1089/hum.2010.231
- Schaffert, D., Kiss, M., Rodl, W., Shir, A., Levitzki, A., Ogris, M., & Wagner, E. (2011). Poly(I:C)-Mediated Tumor Growth Suppression in EGF-Receptor Overexpressing Tumors Using EGF-Polyethylene Glycol-Linear Polyethylenimine as Carrier. *Pharm. Res.*, 28(4), 731-741. doi: 10.1007/s11095-010-0225-4
- Schlessinger, J. (2002). Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell*, 110(6), 669-672. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00966-2
- Schwalbe, M., Buske, N., Vetterlein, M., Höffken, K., Pachmann, K., & Clement, J. H. (2006). The Carboxymethyl Dextran Shell is an Important Modulator of Magnetic Nanoparticle Uptake in Human Cells. *Z. Phys. Chem.*, 220(1_2006), 125-131. doi: 10.1524/zpch.2006.220.1.125
- Shanks, N., Greek, R., & Greek, J. (2009). Are animal models predictive for humans? *Philos. Ethics Humanit. Med.*, 4(1), 2. doi: 10.1186/1747-5341-4-2
- Sharma, B., Peetla, C., Adjei, I. M., & Labhasetwar, V. (2013). Selective biophysical interactions of surface modified nanoparticles with cancer cell lipids improve tumor targeting and gene therapy. *Cancer Lett.*, 334(2), 228-236. doi: 10.1016/j.canlet.2013.03.011
- Shcherbo, D., Murphy, C. S., Ermakova, G. V., Solovieva, E. A., Chepurnykh, T. V., Shcheglov, A. S., . . . Chudakov, D. M. (2009). Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. *Biochem. J.*, 418(3), 567-574. doi: 10.1042/bj20081949
- Shen, M., Gong, F., Pang, P., Zhu, K., Meng, X., Wu, C., . . . Shuai, X. (2012). An MRI-visible non-viral vector for targeted Bcl-2 siRNA delivery to neuroblastoma. *Int. J. Nanomed.*, 7 3319-3332. doi: 10.2147/ijn.s32900
- Shim, M. S., Kim, C. S., Ahn, Y. C., Chen, Z., & Kwon, Y. J. (2010). Combined multi-modal optical imaging and targeted gene silencing using stimuli-transforming nano-theragnostics. *J. Am. Chem. Soc.*, 132(24), 8316-8324. doi: 10.1021/ja100580y

- Shmueli, R. B., Anderson, D. G., & Green, J. J. (2010). Electrostatic surface modifications to improve gene delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 7(4), 535-550. doi: 10.1517/17425241003603653
- St-Pierre, P. R., & Petersen, N. O. (1992). Average density and size of microclusters of epidermal growth factor receptors on A431 cells. *Biochemistry*, 31(9), 2459-2463. doi: 10.1021/bi00124a004
- Stefanick, J. F., Ashley, J. D., Kiziltepe, T., & Bilgicer, B. (2013). A systematic analysis of peptide linker length and liposomal polyethylene glycol coating on cellular uptake of peptide-targeted liposomes. *ACS Nano*, 7(4), 2935-2947. doi: 10.1021/nn305663e
- Stephanopoulos, N., & Francis, M. B. (2011). Choosing an effective protein bioconjugation strategy. *Nat. Chem. Biol.*, 7(12), 876-884. doi: 10.1038/nchembio.720
- Sturani, E., Zippel, R., Toschi, L., Morello, L., Comoglio, P. M., & Alberghina, L. (1988). Kinetics and regulation of the tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor in intact A431 cells. *Mol. Cell Biol.*, 8(3), 1345-1351. doi: 10.1128/MCB.8.3.1345
- Sun, W., & Davis, P. B. (2010). Reducible DNA nanoparticles enhance in vitro gene transfer via an extracellular mechanism. *J. Control. Release*, 146(1), 118-127. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.04.031
- Sun, Y. X., Zhang, X. Z., Cheng, H., Cheng, S. X., & Zhuo, R. X. (2008). A low-toxic and efficient gene vector: carboxymethyl dextran-graft-polyethylenimine. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 84(4), 1102-1110. doi: 10.1002/jbm.a.31520
- Suzuki, M., & Gerstein, M. (1995). Binding geometry of alpha-helices that recognize DNA. *Proteins*, 23(4), 525-535. doi: 10.1002/prot.340230407
- Suzuki, M., Takayanagi, A., & Shimizu, N. (2004). Targeted gene delivery using humanized single-chain antibody with negatively charged oligopeptide tail. *Cancer Sci.*, 95(5), 424-429. doi: 10.1111/j.1349-7006.2004.tb03226.x
- Tagalakis, A. D., Saraiva, L., McCarthy, D., Gustafsson, K. T., & Hart, S. L. (2013). Comparison of Nanocomplexes with Branched and Linear Peptides for SiRNA Delivery. *Biomacromolecules*, 14(3), 761-770. doi: 10.1021/bm301842j
- Tang, Q., Cao, B., Lei, X., Sun, B., Zhang, Y., & Cheng, G. (2014). Dextran–Peptide Hybrid for Efficient Gene Delivery. *Langmuir*. doi: 10.1021/la500905z
- Taratula, O., Garbuzenko, O. B., Kirkpatrick, P., Pandya, I., Savla, R., Pozharov, V. P., . . . Minko, T. (2009). Surface-engineered targeted PPI dendrimer for efficient intracellular and intratumoral siRNA delivery. *J. Control. Release*, 140(3), 284-293. doi: 10.1016/j.jconrel.2009.06.019
- Thibault, M., Astolfi, M., Tran-Khanh, N., Lavertu, M., Darras, V., Merzouki, A., & Buschmann, M. D. (2011). Excess polycation mediates efficient chitosan-based gene transfer by promoting lysosomal release of the polyplexes. *Biomaterials*, 32(20), 4639-4646. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.03.010

- Thibault, M., Nimesh, S., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2010). Intracellular trafficking and decondensation kinetics of chitosan-pDNA polyplexes. *Mol. Ther.*, *18*(10), 1787-1795. doi: 10.1038/mt.2010.143
- Thorsen, G. (1949). Dextran as a plasma substitute. *Lancet*, *1*(6543), 132-134. doi: 10.1016/S0140-6736(49)90422-5
- Tiera, M. J., Shi, Q., Winnik, F. M., & Fernandes, J. C. (2011). Polycation-based gene therapy: current knowledge and new perspectives. *Curr. Gene Ther.*, *11*(4), 288-306. doi: 10.2174/156652311796150408
- Tripet, B., Yu, L., Bautista, D. L., Wong, W. Y., Irvin, R. T., & Hodges, R. S. (1996). Engineering a de novo-designed coiled-coil heterodimerization domain for the rapid detection, purification and characterization of recombinantly expressed peptides and proteins. *Protein Eng.*, *9*(11), 1029-1042. doi: 10.1093/protein/9.11.1029
- Trubetskoy, V. S., Wong, S. C., Subbotin, V., Budker, V. G., Loomis, A., Hagstrom, J. E., & Wolff, J. A. (2003). Recharging cationic DNA complexes with highly charged polyanions for in vitro and in vivo gene delivery. *Gene Ther.*, *10*(3), 261-271. doi: 10.1038/sj.gt.3301888
- Tseng, Y.-C., Mozumdar, S., & Huang, L. (2009). Lipid-based systemic delivery of siRNA. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, *61*(9), 721-731. doi: 10.1016/j.addr.2009.03.003
- van Gaal, E. V. B., van Eijk, R., Oosting, R. S., Kok, R. J., Hennink, W. E., Crommelin, D. J. A., & Mastrobattista, E. (2011). How to screen non-viral gene delivery systems in vitro? *J. Control. Release*, *154*(3), 218-232. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.05.001
- Vercauteren, D., Deschout, H., Remaut, K., Engbersen, J. F. J., Jones, A. T., Demeester, J., . . . Braeckmans, K. (2011). Dynamic Colocalization Microscopy To Characterize Intracellular Trafficking of Nanomedicines. *ACS Nano*, *5*(10), 7874-7884. doi: 10.1021/nn2020858
- Wang, M., & Thanou, M. (2010). Targeting nanoparticles to cancer. *Pharm. Res.*, *62*(2), 90-99. doi: 10.1016/j.phrs.2010.03.005
- Wang, Y., Xu, Z., Zhang, R., Li, W., Yang, L., & Hu, Q. (2011). A facile approach to construct hyaluronic acid shielding polyplexes with improved stability and reduced cytotoxicity. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, *84*(1), 259-266. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.01.007
- Whitehead, K. A., Matthews, J., Chang, P. p. H., Niroui, F., Dorkin, J. R., Severgnini, M., & Anderson, D. G. (2012). In Vitro–In Vivo Translation of Lipid Nanoparticles for Hepatocellular siRNA Delivery. *ACS Nano*, *6*(8), 6922-6929. doi: 10.1021/nn301922x
- Wightman, L., Kircheis, R., Rossler, V., Carotta, S., Ruzicka, R., Kurs, M., & Wagner, E. (2001). Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J. Gene Med.*, *3*(4), 362-372. doi: 10.1002/jgm.187
- Wijagkanalan, W., Kawakami, S., & Hashida, M. (2011). Glycosylated carriers for cell-selective and nuclear delivery of nucleic acids. *Front. Biosci.*, *16* 2970-2987. doi: 10.2741/3892
- Wilhelm, C., Billotey, C., Roger, J., Pons, J. N., Bacri, J. C., & Gazeau, F. (2003). Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials*, *24*(6), 1001-1011. doi: 10.1016/S0142-9612(02)00440-4

- Wotschadlo, J., Liebert, T., Heinze, T., Wagner, K., Schnabelrauch, M., Dutz, S., . . . Clement, J. H. (2009). Magnetic nanoparticles coated with carboxymethylated polysaccharide shells—Interaction with human cells. *J. Magn. Magn. Mater.*, 321(10), 1469-1473. doi: 10.1016/j.jmmm.2009.02.069
- Wu, G. Y., & Wu, C. H. (1987). Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system *J. Biol. Chem.*, 262(10), 4429-4432. Tiré de <http://www.jbc.org/content/262/10/4429.abstract>
- Xue, H. Y., & Wong, H. L. (2011). Solid lipid-PEI hybrid nanocarrier: an integrated approach to provide extended, targeted, and safer siRNA therapy of prostate cancer in an all-in-one manner. *ACS Nano*, 5(9), 7034-7047. doi: 10.1021/nn201659z
- Yamada, Y., Hashida, M., Hayashi, Y., Tabata, M., Hyodo, M., Ara, M. N., . . . Harashima, H. (2013). An approach to transgene expression in liver endothelial cells using a liposome-based gene vector coated with hyaluronic acid. *J. Pharm. Sci.*, 102(9), 3119-3127. doi: 10.1002/jps.23480
- Yin, H., Kanasty, R. L., Eltoukhy, A. A., Vegas, A. J., Dorkin, J. R., & Anderson, D. G. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.*, 15(8), 541-555. doi: 10.1038/nrg3763
- Yoshihara, C., Shew, C. Y., Ito, T., & Koyama, Y. (2010). Loosening of DNA/polycation complexes by synthetic polyampholyte to improve the transcription efficiency: effect of charge balance in the polyampholyte. *Biophys. J.*, 98(7), 1257-1266. doi: 10.1016/j.bpj.2009.11.047
- Yousefi, A., Storm, G., Schiffelers, R., & Mastrobattista, E. (2013). Trends in polymeric delivery of nucleic acids to tumors. *J. Control. Release*, 170(2), 209-218. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.05.040
- Yu, Y., & Chau, Y. (2012). One-step "click" method for generating vinyl sulfone groups on hydroxyl-containing water-soluble polymers. *Biomacromolecules*, 13(3), 937-942. doi: 10.1021/bm2014476
- Yue, Y., Jin, F., Deng, R., Cai, J., Chen, Y., Lin, M. C., . . . Wu, C. (2010). Revisit complexation between DNA and polyethylenimine - Effect of uncomplexed chains free in the solution mixture on gene transfection. *J. Control. Release*, 155 67-76. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.10.028
- Zeng, J., Wang, X., & Wang, S. (2007). Self-assembled ternary complexes of plasmid DNA, low molecular weight polyethylenimine and targeting peptide for nonviral gene delivery into neurons. *Biomaterials*, 28(7), 1443-1451. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.11.015
- Zhang, B., & Mallapragada, S. (2011). The mechanism of selective transfection mediated by pentablock copolymers; Part I: Investigation of cellular uptake. *Acta Biomater.*, 7(4), 1570-1579. doi: 10.1016/j.actbio.2010.11.032
- Zhang, X., Pan, S. R., Hu, H. M., Wu, G. F., Feng, M., Zhang, W., & Luo, X. (2008). Poly(ethylene glycol)-block-polyethylenimine copolymers as carriers for gene delivery: effects of PEG molecular weight and PEGylation degree. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 84(3), 795-804. doi: 10.1002/jbm.a.31343

- Zhong, D., Jiao, Y., Zhang, Y., Zhang, W., Li, N., Zuo, Q., . . . Liu, Z. (2013). Effects of the gene carrier polyethyleneimines on structure and function of blood components. *Biomaterials*, 34(1), 294-305. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.09.060
- Zhu, L., Kate, P., & Torchilin, V. P. (2012). Matrix Metalloprotease 2-Responsive Multifunctional Liposomal Nanocarrier for Enhanced Tumor Targeting. *ACS Nano*, 6(4), 3491-3498. doi: 10.1021/nn300524f
- Zlotnick, A., & Brenner, S. L. (1989). An alpha-helical peptide model for electrostatic interactions of proteins with DNA. The N terminus of RecA. *J. Mol. Biol.*, 209(3), 447-457. doi: 10.1016/0022-2836(89)90009-0

ANNEXE A – DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES DU CHAPITRE 5

SUPPLEMENTAL DATA FOR:

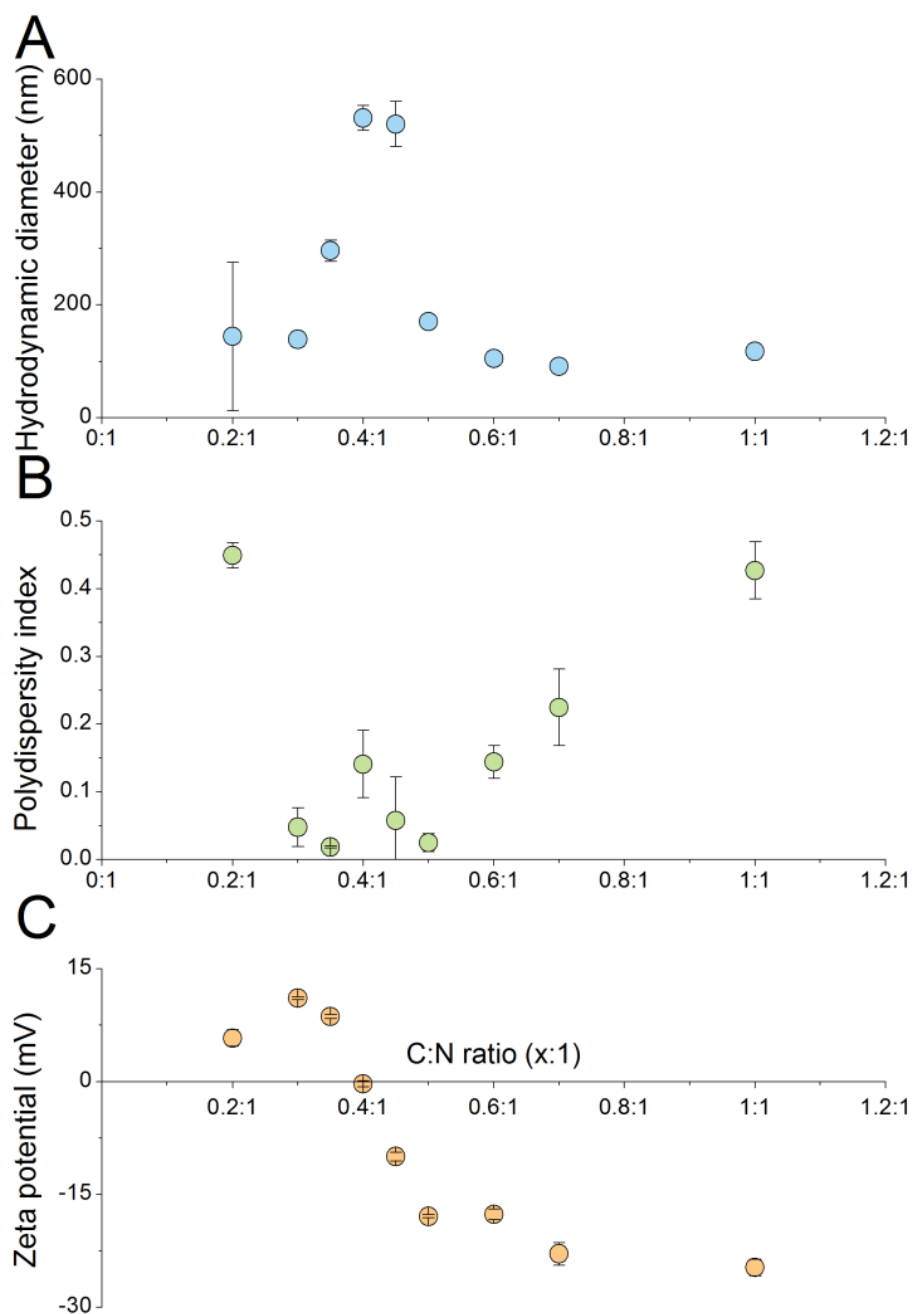
Tailoring the surface of a gene delivery vector with carboxymethylated dextran: a systematic analysis

Charles Fortier^{a,b}, Elodie Louvier^{b,c}, Yves Durocher^{b,c}, and Gregory De Crescenzo^{a,}*

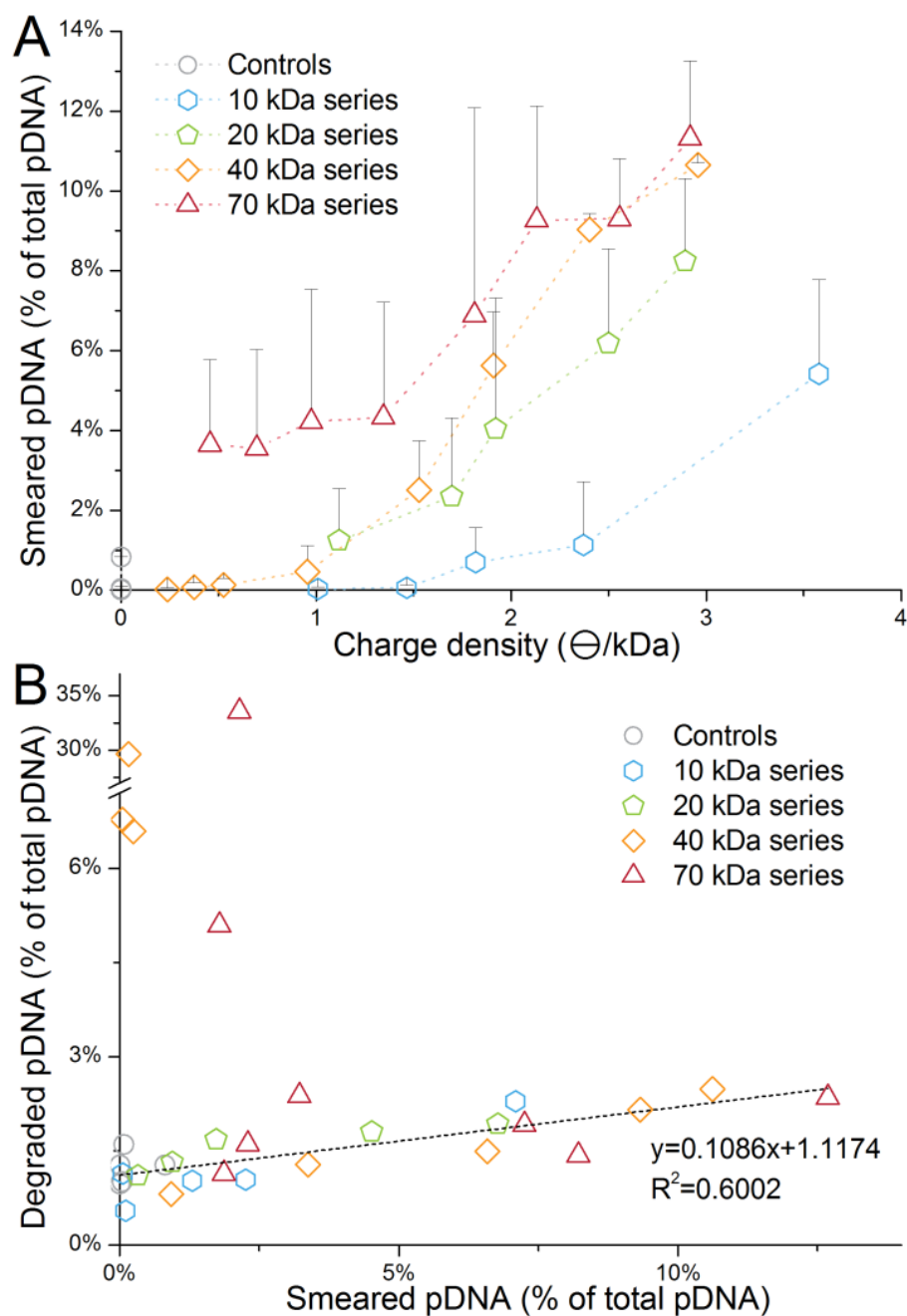
^a Department of Chemical Engineering, Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales (GRSTB), École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montreal (QC), H3C 3A7 Canada.

^b Life Sciences | NRC Human Health Therapeutics Portfolio, Building Montreal-Royalmount, National Research Council Canada, Montreal (QC), H4P 2R2 Canada.

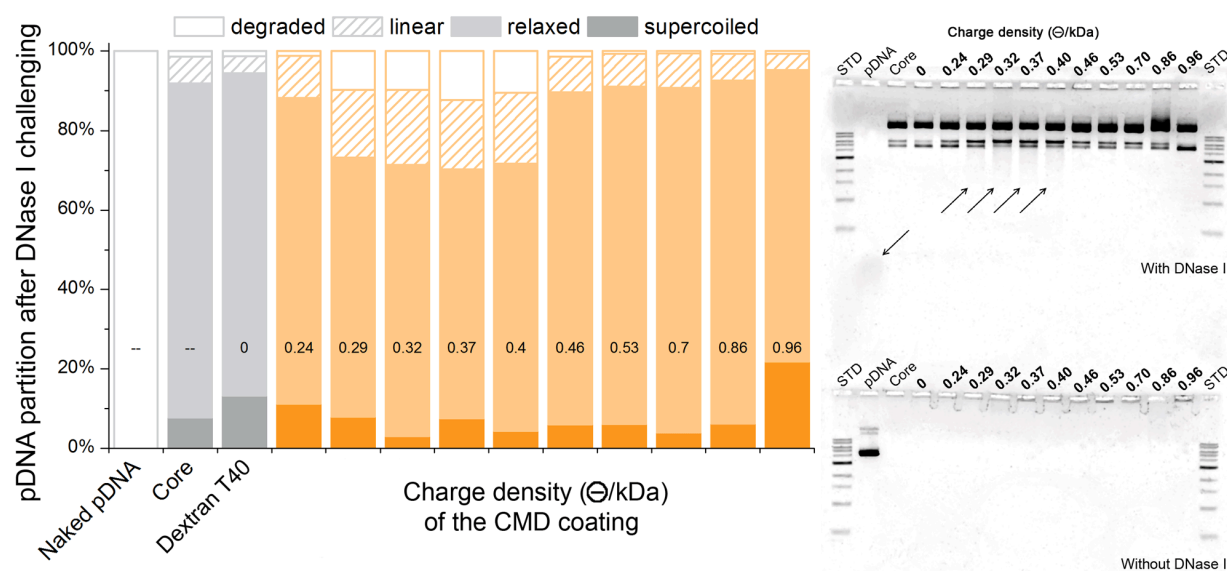
^c Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Université de Montréal, Montréal (QC), H3C 3J7 Canada.



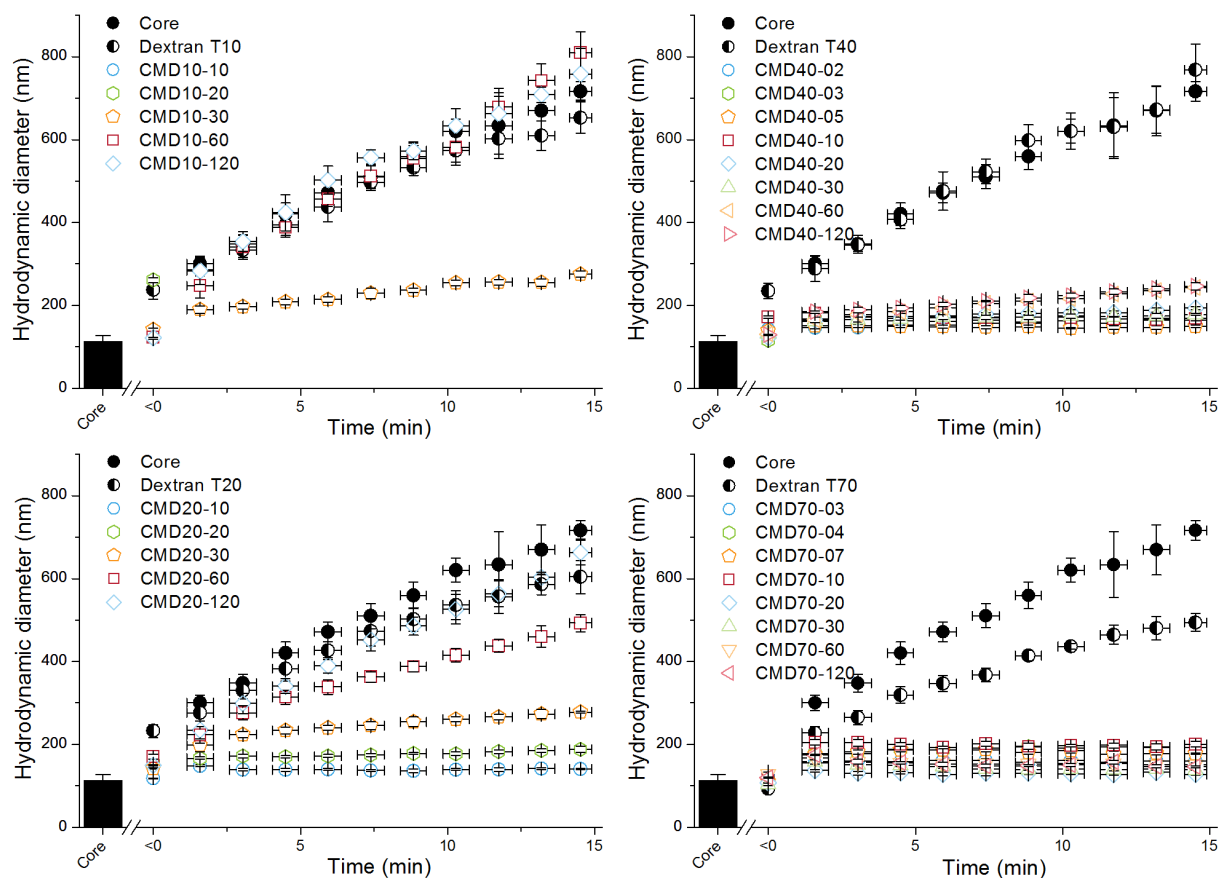
Supplemental Figure A-0-1: DLS characterization of bPEI/CMD70-30 polyplexes. Hydrodynamic diameter (A), polydispersity index (B), and zeta potential (C) of suspensions prepared in complexation buffer at various C:N ratios.



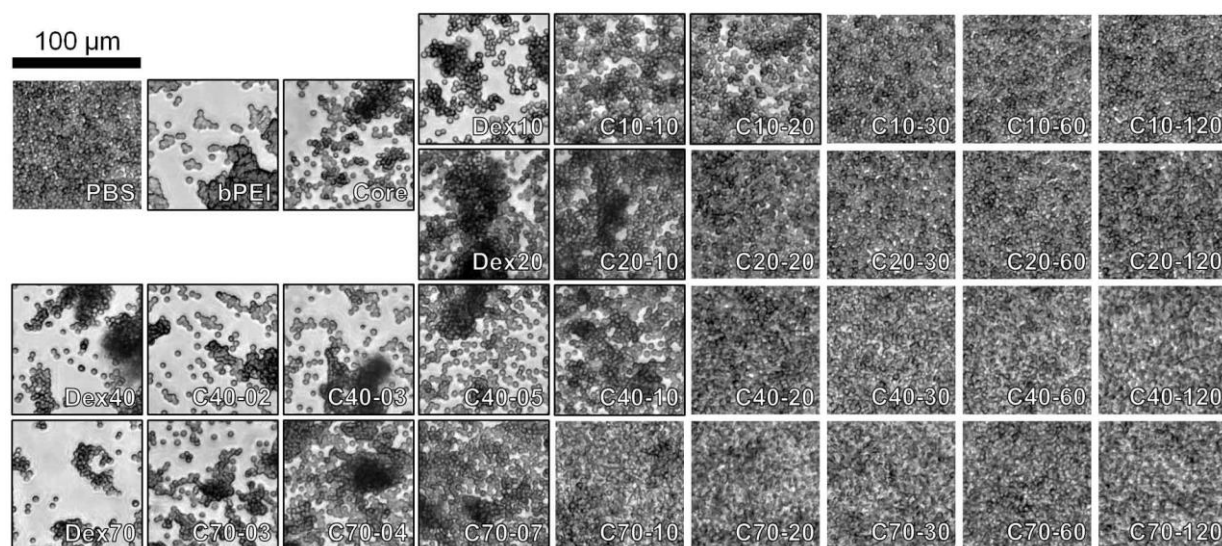
Supplemental Figure A-0-2: Correlations between smeared pDNA and CMD charge density (A), and between degraded pDNA and smeared pDNA (B). The linear regression was computed from the 4 pooled CMD series. Controls and the five CMDs that have a charge density between 0.3 and 0.4 Θ /kDa were withheld from the computation.



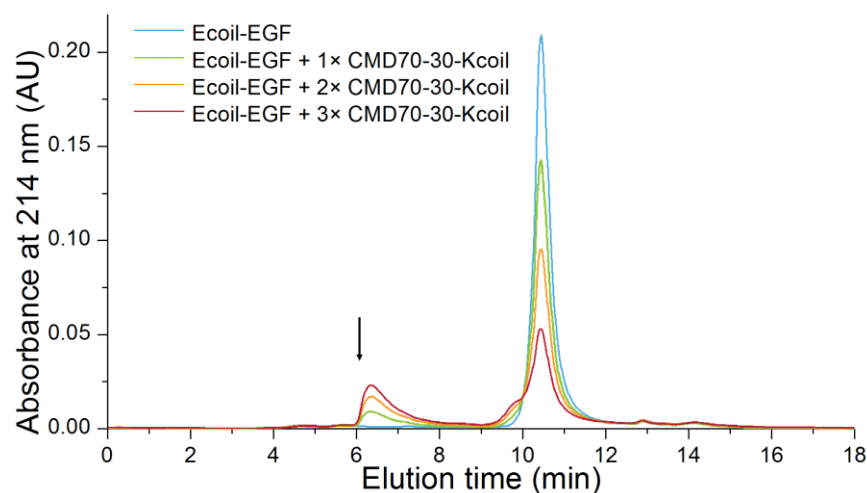
Supplemental Figure A-0-3: Close-up on the influence of CMD on the ability of polyplexes to protect pDNA against DNase I. Representative electrophoretic patterns of coated polyplexes and controls after DNase I challenging followed by polyplex dissociation (top right). Naked pDNA controls challenged by DNase I were completely degraded. Formulations that were neither challenged by DNase I nor dissociated by heparin were also loaded on the agarose gel (bottom right). For clarity purposes, the partition of pDNA after DNase I challenging (left) was generated from the relative intensities of SYBR Safe fluorescence of the bands that were associated with degraded, linearized, relaxed or supercoiled pDNA. Five different batches of CMD were pooled together and sorted by charge density to carry out that experiment.



Supplemental Figure A-0-4: Detailed plots of aggregation kinetics for each CMD series. On each panel, the black column represents the hydrodynamic diameter of core polyplexes, then the data point at the abscissa <0 represents polyplexes that were incubated with the corresponding dextran or CMD for 30 min in complexation buffer. At 0 min, concentrated physiological PBS was added to the suspension to reach a physiological salt concentration.



Supplemental Figure A-0-5: Representative images of erythrocyte aggregation (squared panels) in presence of each polyplex formulation. Controls (top left panels) include buffer only (PBS), bPEI at the concentration corresponding to a virtual N:P ratio of 6:1, and uncoated bPEI/pDNA polyplexes (Core).



Supplemental Figure A-0-6: Titration of Ecoil-EGF by CMD70-30-Kcoil monitored by HPLC. The arrow indicates the exclusion volume of the column. The decrease of the 10.2-min peak corresponding to free Ecoil-EGF allowed to quantify the Kcoil:CMD ratio of the CMD70-30-Kcoil conjugate.

ANNEXE B – PREPARATION OF DEXTRAN-VINYLSULFONE

This protocol was adapted from Yu and Chau 2012 Biomacromolecules. Glassware and reactant quantities are fit to the conjugation of 0.15 g of 70-kDa dextran with divinylsulfone (DVS), at *ca.* 18-20%.

Equipment and reagents

- Dextran (powder, technical grade, Pharmacosmos) (162 g/mol of anhydroglucose units, each of which contains 3 hydroxyl moieties)
- Divinylsulfone (2–6°C in the dark, liquid, pure, Sigma) (118.15 g/mol, 1.177 g/mL, 9.96 M)
- NaOH (pellets) (40 g/mol)
- HCl (12.1 M)
- Milli-Q water
- Pipetman 1000 µL for HCl and DVS pipetting
- 15 mL tubes
- 2 mL snap cap tubes
- Timer
- pH paper
- Amicon Ultra-15, 10 kDa cut-off
- Lyophilizer
- Deuterium oxide (D₂O)

Method

Preparing the solutions and the setting up the reaction

Dextran will be present at *ca.* 2 % ^w/_v in the final reaction mix, which corresponds to *ca.* 0.37 M of dextran hydroxyl groups. The DVS:hydroxyl ratio will be 1¼:1 in the final reaction mix.

1. Prepare the reaction buffer (NaOH 0.03 M, 10 mL)
2. Prepare the stop solution (HCl 12.1 M, 0.022 mL)
3. Weight 0.15 g of dextran powder and dissolve it in 3 mL of reaction buffer in a 15 mL tube (vortexing and sonicating make the powder dissolve faster)
4. In a separate 15 mL tube protected from light with aluminum foil, dilute 0.36 mL of DVS in 4.5 mL of reaction buffer
5. Set the timer for 3 min

Carrying out the reaction

The reaction will be quenched by lowering the pH down to *ca.* 5. Make sure that you add enough HCl to neutralize all the NaOH in one injection. If the resulting pH is too low, you may have enough reaction buffer to compensate for it.

1. Quickly add the entire DVS solution to the dextran solution at $t=0$
2. Keep vortexing the tube throughout the reaction length
3. Quickly add *ca.* 0.3 % v/v of stop solution at $t=3$ min and mix
4. Check that the pH is around 5 with pH paper
5. Write down the actual mm:ss duration of the reaction for the characterization follow-up

Desalting and storing the product

1. Load the mixture in an Amicon Ultracel and top to 15 mL with Milli-Q water
2. Centrifuge for 25 min at $4500\times g$ in a swinging-bucket rotor
3. Discard the filtrate and top to 15 mL with milli-Q water
4. Repeat step 11 and 12 four additional times, adapt the spinning time if needed
5. Collect the retentate and distribute by no more than 1 mL in 2 mL snap cap tubes
6. Allow the samples to freeze at -80°C
7. Load samples in the precooled lyophilizer and freeze-dry overnight
8. Prepare a sample for ^1H -NMR characterization in D_2O (dextran-VS 5 mg/mL, 1 mL) at 50°C (Sylvie Bilodeau, Laboratoire de RMN à haut champ, E-215 Pav. Gaudry, Université de Montréal,)

ANNEXE C – ADDITION DE POLYANION POST TRANSFECTION

C.1 Objectif

La production de r-protéines par expression transitoire de gènes (ETG) en bioréacteur est une technologie charnière dans le développement de nouvelles thérapies à base de glycoprotéines. Le grand intérêt dont elle fait l'objet a d'une part permis de maximiser l'efficacité de certaines étapes de l'ETG, comme par exemple l'internalisation de copies du gène d'intérêt par les cellules transfectées, ou encore la transcription et la post-transcription du gène d'intérêt (Rajendra, Kiseljak, Baldi, Hacker, & Wurm, 2015). Pour augmenter encore les rendements volumétriques d'ETG, une des stratégies est d'augmenter le nombre de cellules exprimant le gène, soit en augmentant leur densité, soit en prolongeant leur durée de vie après transfection. Dans ce contexte, réduire la cytotoxicité inhérente du PEI inhérente lors de la transfection est une piste intéressante.

Dans ce contexte, une étude parue en novembre 2014 faisait état du gain en r-protéine suite à un changement de milieu post transfection au PEI, dans le cadre d'une hypothèse selon laquelle la transfection multiple de la même culture de cellule augmenterait le rendement global en r-protéine (Cervera, Gutiérrez-Granados, Berrow, de las Mercedes Segura, & Gòdia, 2014). Les auteurs argumentent dans ces travaux que le changement de milieu occasionne à la fois une alimentation supplémentaire de nutriments, ainsi qu'une diminution de la toxicité associée à la transfection au PEI.

Or, de notre côté, nous avons observé que l'enrobage de polyplexes à base de bPEI avec du CMD selon une formulation optimisée permettait encore la transfection de cellules *in vitro*. De plus, l'enrobage a rendu le processus moins cytotoxique car les cellules n'étaient plus stressées par la présence de bPEI libre dans le milieu de culture. Toutefois, les performances en termes de production de r-protéines sont restées bien en deçà des rendements typiques obtenus au moyen de la transfection conventionnelle au PEI linéaire. Un exemple représentatif de ce comportement est illustré Figure C-0-7. Ainsi, dans le but de profiter des atouts de chaque méthode, nous avons émis l'hypothèse que l'ajout de polyanion post transfection classique permettait de complexer le PEI libre suffisamment tôt pour en limiter la cytotoxicité, tout en laissant suffisamment de temps aux polyplexes PEI/ADN pour avancer selon le routage intracellulaire menant à une ETG performante.

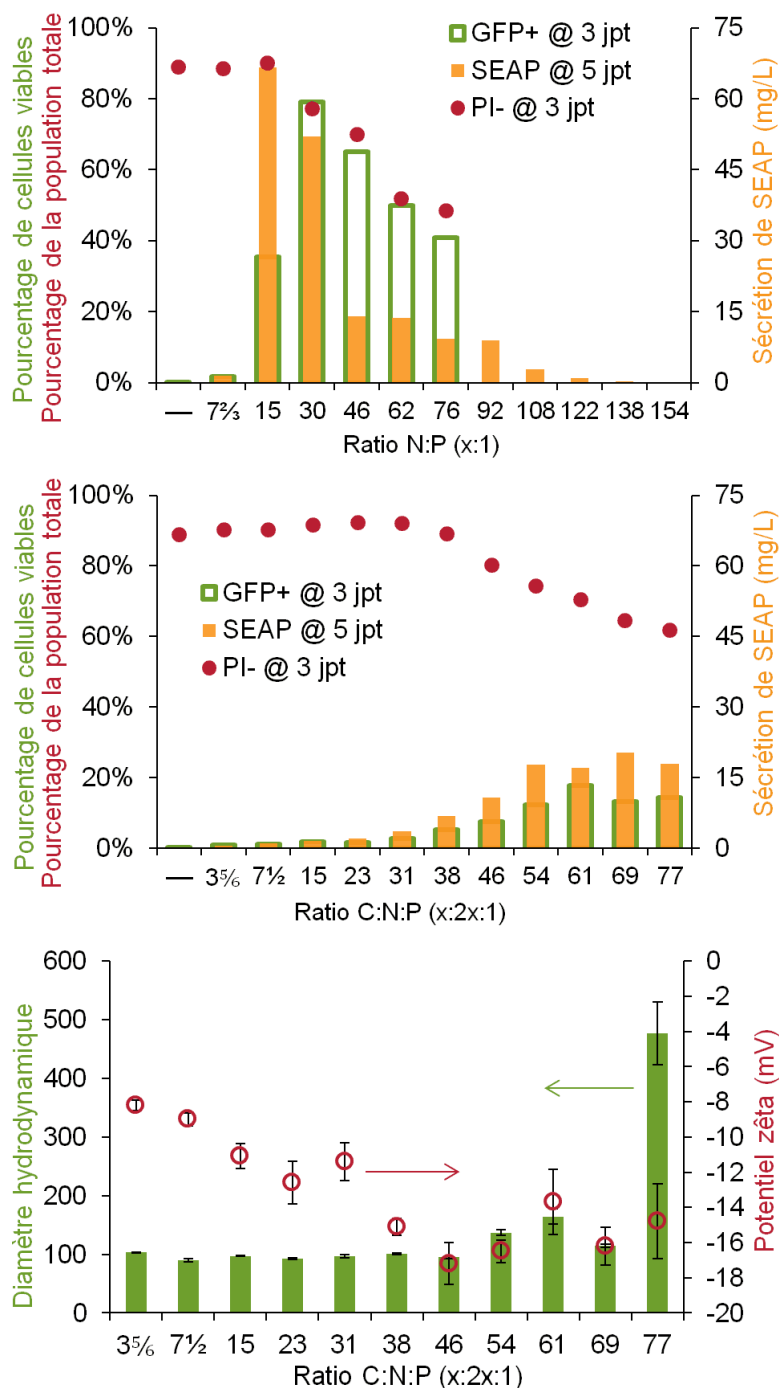


Figure C-0-7 : Performances de polyplexes bPEI/ADNp avec (centre) ou sans enrobage au CMD70-60 (haut) pour la transfection de HEK293 6E et caractéristiques physiques des polyplexes enrobés (bas). Au-delà du rapport N:P 92:1 en absence d'enrobage, il ne restait plus assez de cellules pour mener l'analyse de cytométrie en flux. Les caractéristiques physiques des polyplexes bPEI/ADNp ne sont pas reportées par manque de stabilité suffisante dans le milieu de culture F17 utilisé pour les préparer, selon le protocole utilisé pour la TGE dans notre laboratoire.

C.2 Stratégie

Cette stratégie est donc fondée sur la neutralisation du PEI en excès suite à une transfection conventionnelle PEI/ADN au moyen d'un polyanion. Pour ce faire, nous n'avons pas testé l'entièreté de notre chimiothèque de CMD. Nous n'en avons gardé que le CMD70-60, mais avons sélectionné une série de polyanions susceptibles de complexer l'excès de PEI après transfection. Ces polyanions – polysaccharides à l'exception des plasmides ADN – ont été choisis selon leur disponibilité immédiate au laboratoire ainsi que pour leurs caractéristiques diversifiées, (poids moléculaire, densité de charge, type de porteur de charge, bioactivité) voir Tableau C-0-1 et Figure C-0-8.

Tableau C-0-1 : Produits testés lors de l'étude d'ajout de polyanion post transfection.

Nom	Code	Fournisseur	Numéro de produit	Numéro de lot	M (kDa)	CD (\ominus/kDa)
Héparine	HÉP	Sigma	H-9399	76H1220	18	6.1
Acide alginique	ALG	Sigma	A-2033	127F0547	100	4.5
Acide hyaluronique	HA	Fluka	53747	1293039-216074	1650	2.5
Sulfate de dextrane	DS-500	Sigma	D8906-5G	SLBK4031V	500	1.7
	DS-5		31404-5G-F	BCBM6154V	4.9	1.7
CMD	CM-Dex	Sigma	86524-10G-F	BCBG9516V	15	~1.3
	C70-60	Maison	CMD70-60		76.3	2.6
ADNp d'intérêt	ADNp-i	Maison	pTTo3c-SSH		~4000	3.0
ADNp autre	ADNp-a	Sigma	pTT-BFPq		~4000	3.0

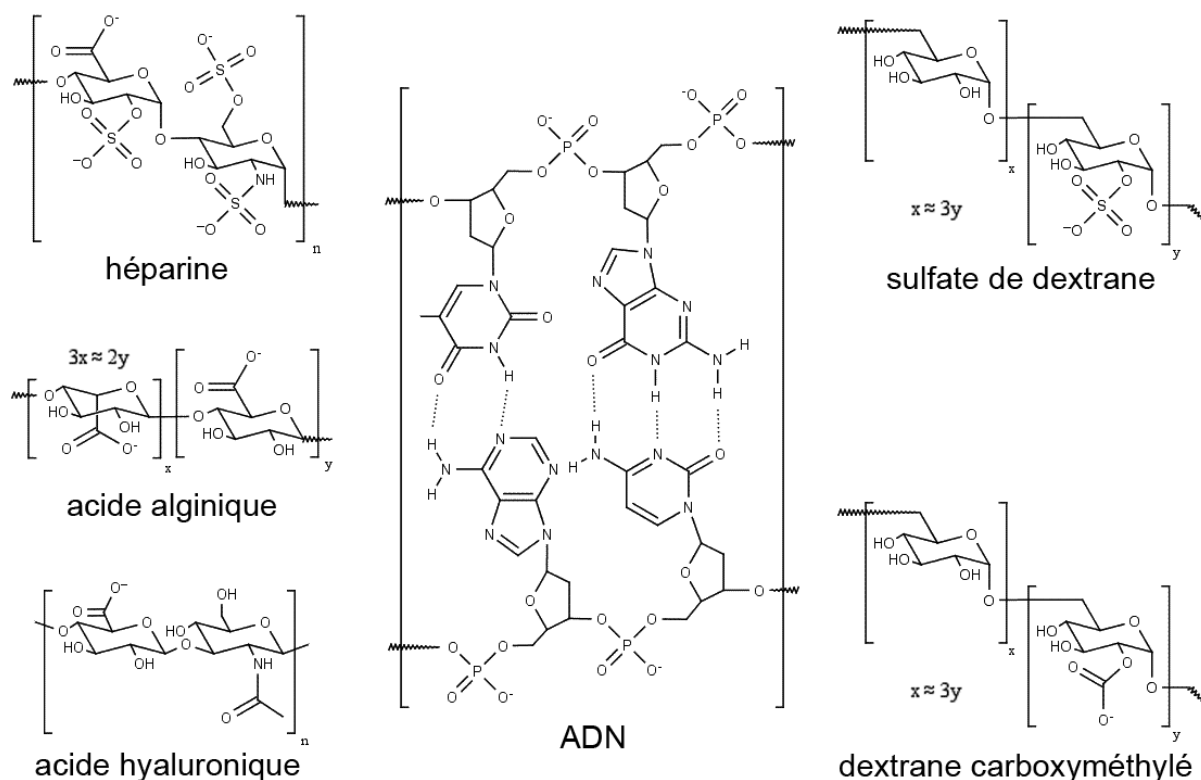


Figure C-0-8 : Structure des polyanions ajoutés après transfection. Y figurent quatre types de porteurs de charge : N-sulfate, O-sulfate, phosphodiester, carboxylate.

Pour mener cette étude, nous avons choisi de mener une étude comparative de la production de phosphatase alcaline embryonnaire sécrétée (SEAP) et de protéine fluorescence verte (GFP) par des cellules HEK293-6E cultivées en suspension dans du milieu F17 dans des plaques 6 puits agitées. Le PEIpro²⁰ a été utilisé comme car c'est un des agents utilisés de manière routinière pour la TGE dans notre laboratoire. Dans ces conditions, la cinétique de transfection au PEIpro indique qu'en quelques minutes les cellules ont capturé des polyplexes en majorité ; et qu'après une heure toute la culture a capturé des polyplexes (Delafosse & Durocher, manuscrit en cours de préparation). Cela suggère qu'à une heure post transfection (hpt) les étapes de délivrance de gènes restantes sont intracellulaires.

La SEAP est une enzyme sécrétée dont le dosage dans le surnageant de culture est réalisé par un test colorimétrique : la SEAP agit en quelques minutes le *para*-nitrophénylphosphate

²⁰ Voir Polyplus-transfection (<http://www.polyplus-transfection.com/fr/peipro-fr/>)

(pNPP) – un substrat peu coloré – dont le produit est jaune. Une lecture spectrophotométrique suivant cette réaction sur quelques minutes suffit à obtenir une concentration en SEAP dans du surnageant de culture dilué (Berger, Hauber, Hauber, Geiger, & Cullen, 1988). Quant à la GFP, sa fluorescence permet de compter par cytométrie en flux la proportion de cellules exprimant cette r-protéine. L'utilisation combinée des deux gènes rapporteurs correspondants est possible, en mélangeant 5–10% de plasmide GFP avec 95–90% de plasmide SEAP (Durocher et al., 2002). Enfin, l'iodure de propidium (PI) est un marqueur fluorescent de mort cellulaire ; il permet de discriminer par cytométrie en flux une cellule viable d'une cellule dont la membrane plasmique a perdu son intégrité (Pham et al., 2005).

C.3 Résultats

Nous avons mené un test préliminaire afin d'évaluer le potentiel de notre approche. Deux formulations de polyplexes ont été retenues : les ratios N:P $7\frac{2}{3}$:1 et $1\frac{1}{2}$:1. Le premier correspond à la formulation effectivement utilisée de manière routinière pour la TGE ; il représente un compromis entre les performances de transfection et la cytotoxicité du PEIpro afin de maximiser le rendement en r-protéine. Le second rapport prend en compte notre hypothèse que si l'on réduit la toxicité du PEI, on peut alors ajouter plus de ce dernier. Nous avons comparé 4 plaques 6 puits comprenant chacune un puits de cellules transfectées avec chacun des deux ratios N:P. Les plaques ont subi le traitement suivant :

CTRL : aucun traitement particulier ;

3×@1h : ajout de 3 µg de CMD70-60 pour 1 µg de PEIpro (rapport molaire de charges $\ominus:\oplus$ de $1\frac{1}{2}$:1 par rapport au PEIpro en excès) à 1 hpt ;

1×@2h : ajout de 1 µg de CMD70-60 pour 1 µg de PEIpro ($\ominus:\oplus$ de $\frac{1}{2}$:1) à 2 hpt ;

L@2h : changement de milieu par centrifugation pour du F17 complémenté frais ;

Les résultats de ce test à 4 jpt sont reportés Figure C-0-9.

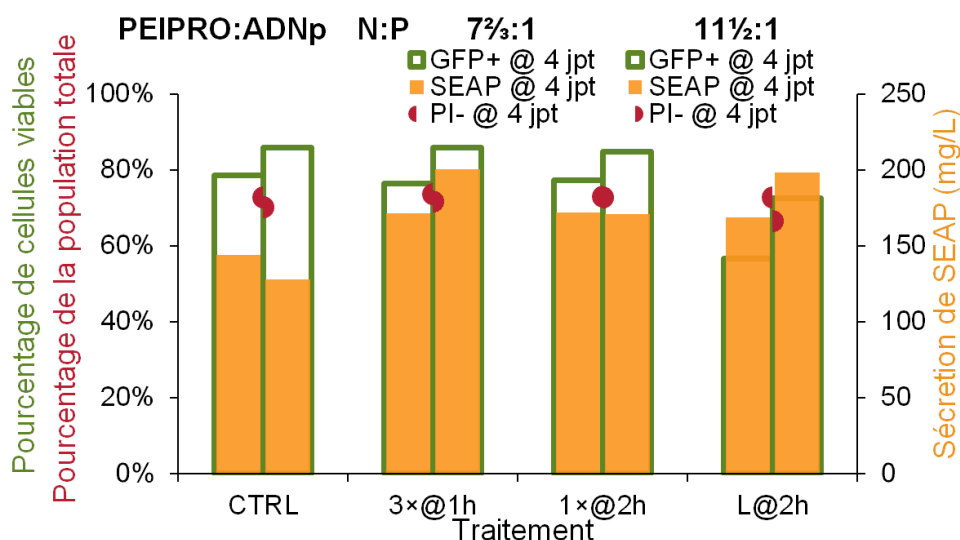


Figure C-0-9 : Résultat préliminaire (n=1) sur l'effet de la neutralisation du PEI en excès après transfection. Performances de la culture à 4 jpt. Rapport N:P de 7²/₃:1 (colonnes de gauche) ou 11¹/₂:1 (colonnes de droite).

La performance d'un procédé de TGE concerne le titre en r-protéine, qui est typiquement sécrétée afin d'en faciliter la purification. Le critère déterminant est donc la concentration en SEAP dans le surnageant de culture. Les données de GFP indiquent la fraction de cellules effectivement transfectées lors de la procédure ; et l'iodure de propidium indique l'état de santé global de la culture. Ici, nous avons observé lors de notre test préliminaire une augmentation du titre en SEAP de 10% à 30% pour toutes les conditions où la neutralisation du PEIpro en excès avait été tentée, que ce soit par lavage ou par complexation avec un polyanion. C'est pourquoi nous avons décidé de mener l'étude plus en détail.

Nous avons ensuite étudié l'influence du délai entre l'ajout des polyplexes et l'ajout du polyanion. Pour cela nous n'avons utilisé que le CMD70-60, au rapport C:N:P 11¹/₂:11¹/₂:1. Cela correspond à un rapport $\ominus:\oplus$ de charge entre CMD70-60 et PEIpro en excès de 3:1. Une quantité assez élevée comme celle-ci a été sélectionnée afin d'observer l'impact du délai et non celui de la quantité ajoutée. Les résultats correspondants sont reportés Figure C-0-10.

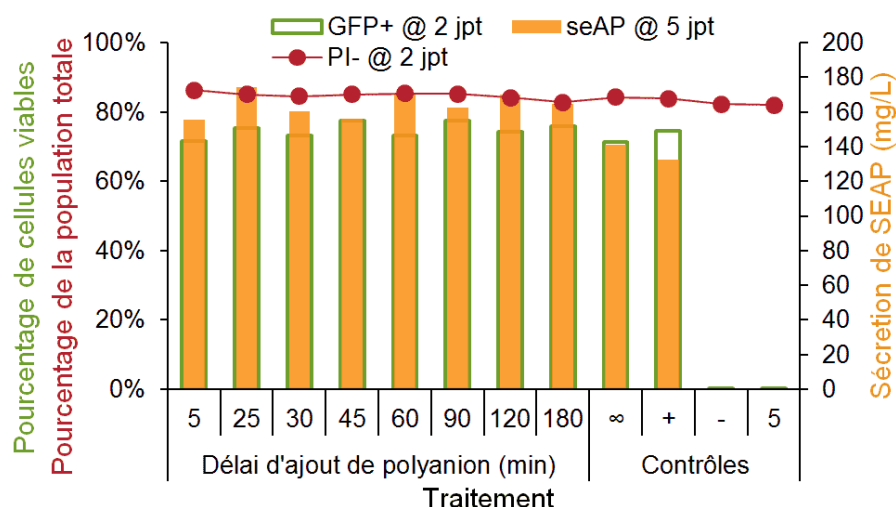


Figure C-0-10 : Influence du délai avant l'addition de polyanion CMD70-60 (n=1) à une culture de cellules HEK293-6E transfectées avec du PEIpro. Le rapport C:N:P 11½:11½:1 a été utilisé, sauf pour le contrôle + au rapport N:P 7⅔:1. Le contrôle « 5 » indique un ajout de polyanion à 5 min sans transfection préalable.

Ces résultats ont indiqué une amélioration de 10–15% par ajout de CMD70-60, sans tendance notable en fonction du délai. Devant le bon nombre de polyanions à tester ainsi que la quantité de polyanion à explorer, nous avons décidé de poursuivre l'étude en choisissant un délai de 60 min. Pour le test suivant, 9 polyanions ont été testés en duplicata. Pour ce faire, nous avons transfecté toutes les cellules en une fois à plus grand volume avant de distribuer celles-ci dans 4 plaques 6 puits. Nous avons opté pour cette technique de par la variabilité de performances de la transfection elle-même. Les résultats sont reportés Figure C-0-11. Il ressort que la transfection à plus grand volume a été moins performante que celle du contrôle positif, de sorte que ce dernier a affiché la meilleure sécrétion de SEAP du test. De plus, les duplicata renseignent sur l'amplitude de la variabilité qui peut apparaître dans ce type de test. Il est à noter que cette variabilité semble être particulièrement corrélée aux plaques 6 puits : par exemple 5 puits sur 6 de la plaque a sont les plus performants de leurs duplicata respectifs, et vice versa pour la plaque c. Nous pouvons tout de même conclure que le DS-500 est inadapté car il a entraîné une chute de tous les indicateurs, rendant la TGE inefficace. Les résultats suggèrent que l'ADNp est également inadapté de par une chute de viabilité de l'ordre de 10% concomitante avec une chute de la sécrétion de SEAP.

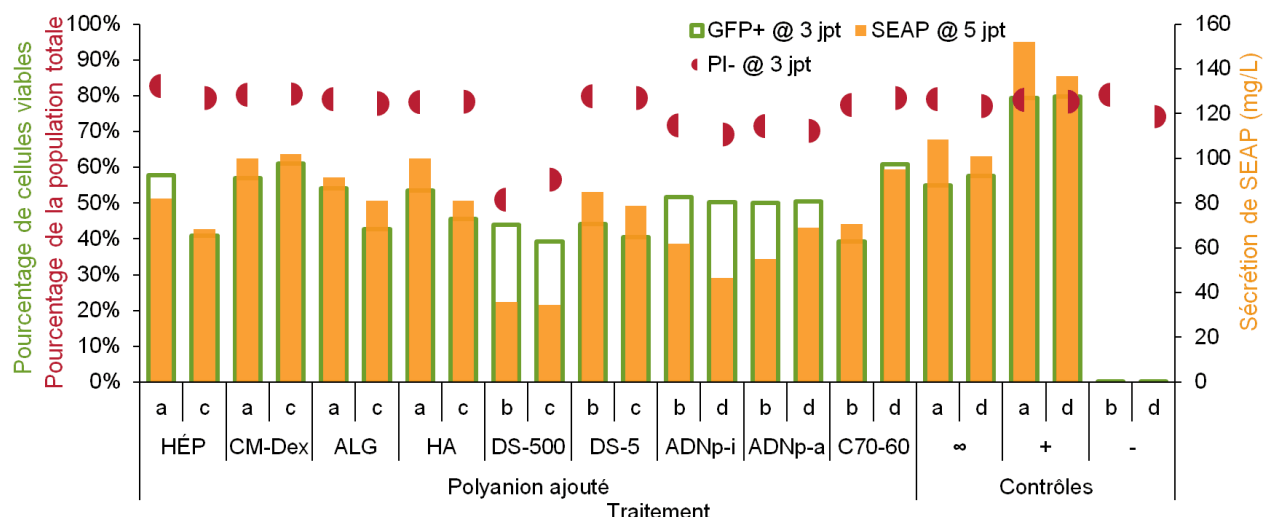


Figure C-0-11 : Impact du type de polyanion ajouté 1 h après transfection. Les duplicata sont juxtaposés et une lettre (a–d) indique dans quelle plaque 6 puits a eu lieu la culture. Les contrôles sont les mêmes qu’à la Figure C-0-10.

Au vu de ces résultats, ni la masse molaire moléculaire, ni la densité de charge semblent être des paramètres déterminants dans notre procédé : le DS-500 est ni le plus lourds, ni le plus densément chargé des polyanions. L’ADNp est quant à lui le plus lourd de nos polyanions, mais la chute de viabilité ainsi que de rendement de TGE occasionnées sont moins parquées que pour le DS-500. À titre indicatif, les données de cytométrie quant à l’expression du gène correspondant à l’ADNp ajouté après transfection sont reportées Figure C-0-12. Ces résultats indiquent que cet ADNp ajouté seul avait le pouvoir de transfecter des cellules déjà transfectées (GFP+) – environ 5% des cellules viables (GFP+ BFP+), – mais pas celles non encore transfectées (GFP–).

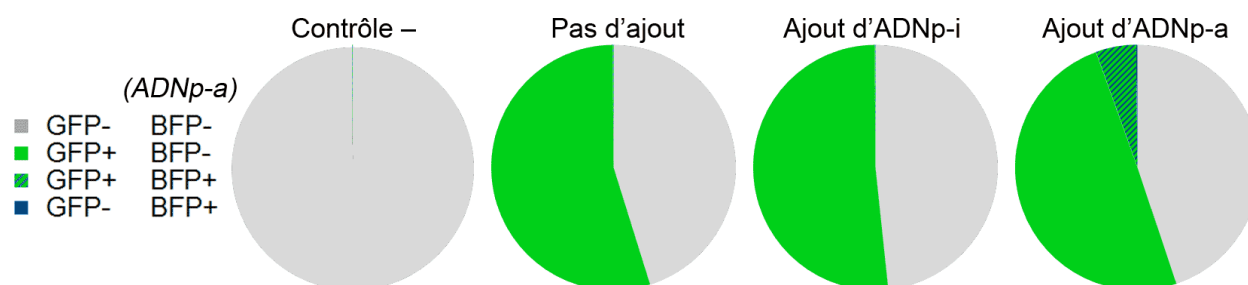


Figure C-0-12 : Contribution à l’ETG de l’ADNp ajouté après transfection.

C.4 Discussion

Dès le premier essai (Figure C-0-9), la variabilité inter-plaques 6 puits nous a induit en erreur quant à la validité de notre hypothèse. Une telle erreur aurait certainement pu être évitée en répliquant le test avant de diversifier l'exploration des paramètres pertinents à l'étude. Ainsi, il est intéressant de noter que l'empilement de plaques 6 puits tel que nous le pratiquons pour la culture de cellules en suspension est peut-être problématique si des comparaisons inter-plaques sont envisagées. Nous n'avons malheureusement pas pu mettre en évidence l'effet spécifique de chaque position dans l'empilement de plaques car lors de vérifications et de collections périodiques d'échantillons l'ordre des plaques pouvait se trouver modifié.

Une seconde observation intéressante issue de cette étude concerne la transfectibilité d'une culture de cellules avec de l'ADNp seul suite à une transfection au PEI (Figure C-0-12). Dans notre test, seules des cellules ayant été efficacement transfectées lors de la transfection au PEI (GFP+) ont pu ensuite capturer puis exprimer le second transgène (BFP+). Cela est possiblement lié au cycle cellulaire – plus propice en phase G2/M en particulier (Midoux et al., 2008). En effet si celui-ci est (dé)favorable à la première transfection il le sera encore probablement pour la seconde. Autrement, cela pourrait aussi être lié à l'absorption d'une quantité-seuil de PEI permettant le déverrouillage de l'ETG. Dans cette seconde hypothèse, la capture de plasmides ajoutés 1 h après le PEI pourrait mener à la fusion des endosomes les transportant avec les endosomes prêts à éclater contenant les premiers polyplexes, tirant donc parti de l'imminente performance de ces derniers.

En conclusion, notre hypothèse de départ se trouve invalidée car nous n'avons mis en évidence aucun traitement menant de façon reproductible à une augmentation significative du rendement en r-protéine. L'emploi de polyanions pour la neutralisation du PEI en excès a possiblement plus d'avenir dans un contexte *in vivo*.